

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1931-1932 — N° 269

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine
et de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

**RECHERCHE ET NUMÉRATION
DU COLI-BACILLE DANS LE LAIT
PAR LA MÉTHODE AU ROUGE NEUTRE**

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 12 Décembre 1931

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Théodor VASSILEFF

Né le 5 Mars 1905 à TESTEDJI (Bulgarie)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

1931

RECHERCHE et NUMÉRATION du COLI-BACILLE dans le LAIT
par la MÉTHODE au ROUGE NEUTRE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1931-1932 — N° 269

Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine
et de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

RECHERCHE ET NUMÉRATION
DU COLI-BACILLE DANS LE LAIT
PAR LA MÉTHODE AU ROUGE NEUTRE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 12 Décembre 1931

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Théodor VASSILEFF

Né le 5 Mars 1905 à TESTEDJI (Bulgarie)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

—
1931

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur..... M. Ch. PORCHER.

Directeur honoraire. M. F.-X. LESBRE.

Professeurs honoraires M. ALFRED FAURE, ancien Directeur.
M. CADÉAC.

PROFESSEURS

Physique et chimie médicale, Pharmacie, Toxicologie..	MM. PORCHER
Botanique médicale et fourragère, Zoologie médicale, Parasitologie et Maladies parasitaires.....	MAROTEL
Anatomie descriptive des animaux domestiques, Téra- tologie, Extérieur	TAGAND JUNG
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière médicale	
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologique, Inspection des denrées alimentaires et des établis- sements classés soumis au contrôle vétérinaire...	BALL
Pathologie médicale des Equidés et des Carnassiers, Clinique, Sémiologie et Propédeutique, Jurispru- dence vétérinaire	AUGER
Pathologie chirurgicale des Equidés et des Carnas- siers, Clinique, Anatomie chirurgicale, Médecine opératoire	DOUVILLE
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Clinique, Médecine opératoire, Obstétrique.....	CUNY
Pathologie générale et Microbiologie, Maladies micro- biennes et police sanitaire, Clinique.....	BASSET LETARD
Hygiène et Agronomie, Zootechnie et Economie rurale.	

PROFESSEUR AGRÉGÉ

Industrie et contrôle des produits d'origine animale.....	TAPERNOUX
---	-----------

CHEFS DE TRAVAUX

MM. COLLET, JEAN-BLAIN.



EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. le Dr ROCHAIX, Professeur à la Faculté de Médecine
Chevalier de la Légion d'honneur.

Assesseurs : M. TAPERNOUX, Professeur agrégé à l'Ecole Vétérinaire.
M. BASSET, Professeur à l'Ecole Vétérinaire

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

Auxquels je dois tout, je leur dédie
ce modeste travail, bien faible hom-
mage de respectueuse affection et de
vive et profonde reconnaissance.

A MES CHERS FRÈRES ET SŒURS

Témoignage d'affection et de recon-
naissance infinie pour tous leurs sacri-
fices.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ROCHAIX

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon

Sous-Directeur de l'Institut Bactériologique

Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous le remercions du très grand honneur qu'il nous fait en présidant notre thèse et nous l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BASSET

Nous lui sommes reconnaissant d'avoir bien voulu faire partie de notre jury.

Qu'il veuille croire à nos sentiments bien respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ TAPERNOUX

Qui, au cours de nos études nous donna tant de marques de sympathie et nous fut d'un précieux secours dans l'élaboration de ce travail.

Avant-propos

Arrivé au terme de nos études, c'est pour nous un agréable devoir, avant de retourner dans notre Patrie, d'exprimer à la France, qui nous a si affectueusement accueilli pendant les quatre années de nos études, le témoignage du souvenir ineffaçable que nous emporterons d'elle, de sa culture, de ses savants et de sa civilisation. Nous souhaitons que les liens qui unissent la Bulgarie et la France se resserrent toujours davantage et nous ferons — en ce qui nous concerne personnellement — tout pour contribuer à cette union plus étroite et particulièrement nécessaire.

Notre reconnaissance est surtout acquise aux éminents Maîtres de l'Ecole Vétérinaire de Lyon et à ceux de la Faculté de Médecine qui, sans ménager leur temps et leurs efforts nous ont dispensé sans compter les connaissances que nous possédons.

Nous remercions bien vivement le Professeur Ch. Porcher dont nous avons constamment éprouvé la science et la grande sollicitude comme Directeur de l'Ecole : appelé tout récemment à présider aux destinées de toutes les Ecoles Vétérinaires Françaises, c'est pour nous une joie que de lui témoigner ici toutes nos félicitations,

Au Professeur Rochaix qui nous a accueilli avec tant de bonté et tant de sollicitude dans son laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine et qui nous a permis de réaliser au mieux ce travail, nous apportons l'hommage de notre déférente reconnaissance.

Nous associons également, dans une pensée de commune gratitude, M. le Professeur agrégé Tapernoux à qui nous devons l'idée de ce travail et qui a suivi nos recherches en les orientant avec le plus grand dévouement et le plus grand désir de les voir aboutir à un résultat positif.

Nous sommes très heureux que M. le Professeur Basset ait accepté de faire partie de notre Jury de Thèse et nous lui adressons nos bien vifs remerciements.

Enfin, nous ne voulons pas passer sous silence M. Léon Josserand, préparateur du Laboratoire d'Hygiène, dont nous avons mis si largement à contribution les connaissances techniques et l'expérience bien connue : à lui aussi nous adressons quelques fleurs détachées à la gerbe de nos remerciements.

RECHERCHE et NUMÉRATION du COLI-BACILLE dans le LAIT par la MÉTHODE au ROUGE NEUTRE

Introduction

Les sources de contamination du lait

Par sa composition chimique, par sa réaction, par la lenteur de son refroidissement, le lait, si on ne prend pas la précaution de le refroidir après sa récolte, constitue pour les nombreux microbes qu'une traite malpropre y aura déversés, un excellent milieu de culture, et, malgré la phase « bactéricide » qui commence et se poursuit quelques heures après la mulsion, la plupart des germes qui l'ontensemencé y pullulent bientôt.

Les sources de contamination du lait sont nombreuses :

1° Le lait peut tout d'abord être infecté dans la mamelle même, soit par voie centrifuge, l'infection étant d'origine sanguine (tuberculose, fièvre aphteuse, fièvre méditerranéenne, etc...), soit par voie centripède, l'infection étant d'origine externe (mammites à streptocoques, par exemple) ;

2° Le lait peut être souillé, dès son contact avec l'extérieur, par des microbes de provenances diverses.

La contamination est le fait de l'homme : diphtérie, scarlatine, typhoïde, rougeole, choléra ; elle vient de l'animal par ses excréments, sa microflore cutanée, ses écoulements vaginaux ; elle résulte du milieu : poussières du sol, du fourrage, etc...

Parker résume, dans le tableau suivant, ces diverses sources de contamination :

1° La vache. — Pis ; fèces et urines ; écoulements de la bouche et du nez ; peau et annexes.

2° Le milieu. — Air, plafond, planchers, bat-flanc, nourriture, fourrage, litière, ustensiles, seaux, eau et glace.

3° L'homme. — Ecoulement du nez et des oreilles ; fèces et urines ; peau et vêtements.

4° Les parasites. — Les mouches.

Les diverses espèces pathogènes que le lait peut contenir étant laissées de côté, les bactériologistes ont choisi, pour déceler la contamination indésirable par les matières fécales du lait comme de l'eau, certains « tests » dont la valeur et la signification paraissent indiscutables.

Les recherches du *Bacterium coli*, du *Bacillus lactis aerogenes*, du *Bacillus enteritidis* sporogènes et de certains streptocoques, sont celles qui ont été le plus communément choisies par les hygiénistes de différents pays pour apprécier la contamination du lait par les matières fécales.

CHAPITRE PREMIER

Le colibacille

Le colibacille a été isolé par Escheriche (1885) des matières fécales du nouveau-né. On l'a rapidement trouvé dans l'intestion de l'homme et des animaux, dans le gros intestin surtout où il est constamment présent, d'où ses noms de colibacille, *Bactérium coli*, *Bacillus coli communis*.

Si le bacille d'Eberth et les Paratyphiques constituent des espèces bien différenciées, l'espèce colibacille n'a pas de limites bien tranchées. Il y a, en réalité, un groupe de races bacillaires qu'on appelle : les Colibacilles. Dans ce groupe sont rangés une foule de bacilles très voisins, mais non absolument identiques. On a créé pour eux le nom de Paracolibacilles. (Gilbert et Lion, Tavel et Lauz, Van de Velde, Beco, Widai et Nobecourt). L'espèce n'est pas franchement fixée.

A. — *Isolement. Cultures*

1° *Isolement.* — On emploie les mêmes procédés que pour l'Eberth. Il suffit de cultiver une parcelle de matière fécale quelconque.

2° *Caractères généraux des cultures.* — Comme pour le Bacille d'Eberth, mais la végétation est un peu plus rapide et plus abondante. Odeur urineuse. Le colibacille végète dans les milieux solides où ont déjà végété des colonies de Bacille d'Eberth, qu'on a enlevées par grattage (Chantemesse et Widal).

Le phénomène est cependant inconstant. Le colibacille végète dans les milieux acides, par exemple dans l'urine fraîche.

3° *Cultures sur milieux solides.* — Identiques à celles du bacille d'Eberth sur les milieux ordinaires, sauf sur la pomme de terre où la culture est habituellement épaisse, luisante, brunâtre. (La pomme de terre ne change pas de couleur, ce qui distingue des cultures de morve) ; mais ce caractère peut manquer et la culture être fine et vernissée (pomme de terre nouvelle) comme celle du bacille d'Eberth peut être grosse et épaisse. Le développement serait plus intense sur gélatine-touraillon. La culture sur artichaut est vert émeraude (Roger), grâce à une oxydase (J. Roux).

a) Gélose lactosée tournesolée : vire nettement au rouge avec dislocation du milieu par les gaz produits.

b) Gélose tournesolée, additionnée de glucose, de levulose, de galactose, de maltose, de mannite : virage au rouge avec dislocation du milieu.

c) Gélose au rouge neutre : vire au jaune canari, avec fluorescence verte, comme le paratyphique.

d) Gélose au sous-acétate de plomb : ne noircit pas ; quelques exceptions.

e) Gélose de Drigalski-Conradi, d'Endo ; donne sur ces milieux des colonies rouges.

4° Culture en milieux liquides

a) Bouillon : comme le B. d'Eberth.

b) Bouillon lactosé et tournesolé : fait virer rapidement au rouge. Capital.

c) Bouillon lactosé et carbonaté : dégagement gazeux. Il en est de même pour les bouillons levulosés, galactosés, maltosés, mannités, etc...

d) Bouillon arsenical : y végète.

e) Bouillon au rouge neutre : vire au jaune canari avec fluorescence verte, tandis que le B. d'Eberth le laisse rouge.

f) Milieux minéraux : végète abondamment.

g) Bouillon vacciné : y végète rapidement.

h) Lait : coagulation en 24 heures. Capital. Le coagulum est surmonté d'un liquide jaunâtre ; parfois la coagulation est totale.

i) Petit lait tournesolé : vire au rouge. Acidité considérable.

j) Milieux minéraux : végète dans la plupart d'entre eux.

B. — *Coloration. Caractères microscopiques*

1° *Coloration.* — Se colore bien par toutes les couleurs basiques d'aniline. Ne prend pas le Gram.

2° *Forme.* — Dans l'organisme : petits bacilles (2 à 3 ω sur 0,6 à 0,7 ω), droits, à bords arrondis, à protoplasma homogène. Très polymorphe dans les cultures. Jeune il est grêle et court, parfois réuni par deux. Certains échantillons sont rapidement très longs. Dans les vieilles cultures, surtout en gélatine, il s'allonge beaucoup et les formes d'involution ne sont pas rares. Sur gélose et sur pomme de terre, il est en général large et trapu. Les cultures très anciennes sur pomme de terre donnent souvent des éléments longs avec de nombreux espaces clairs. Formes longues en milieux salins.

3° *Mobilité.* — Moins mobile que B. d'Eberth. Mobilité très variable suivant les échantillons. Cils moins nombreux et plus difficiles à colorer ; 4 à 6 par bacille, souvent par bouquets aux extrémités, moins longs que ceux des B. d'Eberth.

4° *Spores.* — Pas de spores. Simplement des condensations protoplasmiques (pseudo-spores) comme le B. d'Eberth.

C. — *Caractères biologiques*

1° *Habitat.* — Il existe dans le tube intestinal de l'homme et des animaux, dès les premières heures qui suivent la naissance (avant que l'enfant ait rien ingéré). Chez l'enfant, il est à peu près pur avec le bacille lactique ; chez l'adulte, la flore intestinale est très riche. Chez les fébricitants, le colibacille existe à peu près seul dans l'intestin (Bard et Aubert).

On le trouve dans l'eau, dans le sol, dans les poussières, partout, en un mot, où les souillures par ma-

tières fécales ont pu pénétrer. C'est un des microbes les plus répandus dans la nature.

2° *Flore intestinale*. — Elle a été l'objet d'études très suivies (Koch, Metchnikoff, Tissier, etc...).

Tissier (1900) a spécialement étudié la flore des nourrissons et a décrit, à côté du colibacille, un anaérobie, le *B. bifidus*, qui est même prédominant lorsque le nourrisson est nourri au sein. Ce microbe (prédominant aussi chez les jeunes chiens), paraît très important. Mlle Tsinklinsky (1903) l'a retrouvé à Moscou. Escheriche l'a rencontré. Il paraît exister presque pur avant le colibacille.

Marmaberg avait décrit, chez l'adulte, 27 espèces en 1898 ; en 1902, avec du bouillon de foie légèrement acide, Matzuschta en trouve 44.

A Moscou, Mlle Tsiklinsky a trouvé des thermophiles stricts (+ 57°) qu'on ne rencontre pas à Paris.

Masfazen, Nencki, Mme Sieber (1900) ont montré que les microbes intestinaux sont surtout abondants dans le côlon. D'ailleurs, pour Schutz, Korlbrugge, Delezenne, l'intestin grêle aurait un certain pouvoir bactéricide.

C'est donc le côlon qui est l'organe nuisible chez l'homme, celui où végètent tous les microbes nuisibles à la santé, d'après Metchnikoff. On connaît la théorie de ce savant, d'après laquelle la vieillesse est une conséquence, en grande partie, des putréfactions intestinales (dues surtout aux anaérobies) qui se passent dans le gros intestin, cet organe ancestral et nuisible, trop développé chez l'homme. L'homme peut vivre et engraisser sans gros intestin. Son ablation rendrait de grands services à la santé.

Une nourriture (lait caillé par le ferment bulgare) qui ferait l'antisepsie du gros intestin, favoriserait grandement la santé et la longévité. Telle est la théorie si originale de Metchnikoff.

Les microbes intestinaux peuvent être nuisibles par leurs toxines (auto-intoxications, phénols des urines, botulisme, etc...) ou en pénétrant par la muqueuse saine (Nocard, Porcher, Nicolas) ils peuvent favoriser certaines infections (voir choléra).

S'il est des microbes intestinaux nuisibles, en existe-t-il d'utiles ? Très certainement. Si les cobayes peuvent vivre sans microbes (Nuttall et Thierfelder, 1895), le poussin aseptique meurt (Schottelins, 1899). Les têtards de grenouilles privés de microbes vivent, mais cachectiques (Mme Metchnikoff). Donc quoi qu'en dise Neneki, il y a des microbes intestinaux utiles. Bienstock (1902), Tissier et Martelly (1902) ont montré que certains microbes empêchent la putréfaction intestinale en sécrétant des acides qui entravent la pullulation des anaérobies. Lotti (1909) a étudié plus spécialement les anaérobies des intestins, lesquels disparaissent dans les cas d'entérite.

3° *Vitalité*. — Plus grande que celle du bacille typhique. Si onensemence les deux microbes en même temps dans un même milieu, on ne trouve plus, au bout de quelques jours, que le colibacille.

4° *Virulence*. — Sa virulence est des plus variables. Isolé de l'homme sain, il est presque toujours peu virulent. Au contraire, il devient très virulent dans les états fébriles, dans beaucoup d'affections intestinales, dans la fièvre typhoïde. Il l'est au maximum lorsqu'il est l'agent de la maladie.

On se procure facilement du colibacille virulent en saturant l'anus d'un cobaye. Il se produit une obstruction intestinale, de la péritonite ; le bacille qui est dans la sérosité louche du péritoine est très virulent.

On exalte le colibacille par quelques passages dans le péritoine ou mieux dans la plèvre du cobaye.

Les cultures sur gélose sont plus virulentes que celles en bouillon.

La virulence peut se conserver assez longtemps dans les cultures.

5° *Action sur les sucres.* — Le colibacille fermente la plupart des sucres : lactose, glucose, levulose, galactose, maltose, mannite, glycérine (Chantemesse, Perdrix, Widal). Il se produit alors :

- 1° Des gaz (hydrogène, acide carbonique, etc., etc.) ;
- 2° Des acides (lactique droit ou gauche, acétique, formique, butyrique, succinique).

Ces deux propriétés sont celles qui sont mises en lumière par les procédés de culture déjà connus (milieux lactosés et tournesolés ou additionnés de rubine acide, bouillon lactosé et carbonaté, lait) et qui différencient les deux microbes. Rappelons que certains colibacilles peuvent avoir perdu leurs propriétés fermentatives.

Le colibacille de l'animal fait de l'acide lactique droit, tandis que celui de l'homme adulte fait de l'acide lactique gauche ; celui du nourrisson ferait de l'acide droit (Péré). Tous font de l'acide succinique (Grimbert). Le colibacille ne fait pas fermenter la saccharose. Cependant certains échantillons ont une action sur ce sucre. Il en est de même pour la dulcité,

6° *Action dénitrifiante.* — Le colibacille réunit les nitrates alcalins en produisant des nitrites ou même de l'azote libre (Hugounencq et Doyon). Il faudrait, pour Grimbert, la présence de composés amidés.

7° *Formation d'indol.* — Les colibacilles types donnent toujours de l'indol. Il faut, pour que la réaction ait toute sa valeur, s'assurer au préalable que la peptone utilisée n'en renferme pas.

D. — *Réactions vis-à-vis des sérums*

Agglutination. — Certains colibacilles sont agglutinés à 1/10 ou 1/20 par le sérum d'homme normal ou de cobaye adulte normal.

Le sérum des hommes typhiques n'agglutine pas plus que le sérum normal de colibacille. Contesté par certains, ce fait important a été démontré par P. Courmont et Lesieur, dans une étude faite avec de nombreux malades et des colibacilles de laboratoire.

Le sérodiagnostic n'existe pas.

Quant au pouvoir agglutinant du sérum des animaux immunisés, la question est très complexe.

E. — *Paracolibacilles*

Un grand nombre de colibacilles, tout en présentant les caractères principaux du microbe type, s'en séparent par un ou plusieurs caractères importants. Depuis Gilbert et Lion ils sont désignés sous le nom de paracolibacilles.

Avec Dopter et Sacquépée, nous en distinguerons cinq types principaux :

1° *Type immobile*. — Trouvé dans une endocardite infectieuse ;

2° *Type anindologène*. — Assez fréquent ;

3° *Type immobile et anindologène*. — C'est un type très approché du *B. lactis aërogènes* ;

4° *Type ne faisant pas virer le rouge neutre*. — Très rare ;

5° *Type chromogène*. — Auquel on doit identifier le bacille de la diarrhée verte de Lesage.

En réalité il règne la plus grande confusion en ce qui concerne les paracolibacilles.

Ce groupe de microbes est devenu un véritable *cohut mortuum* de la bactériologie (voir à ce sujet le mémoire de Mandoul et Gruat).

Mandoul et Gruat : « Contribution à l'étude bactériologique des eaux. Les bacilles coliformes ». *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIX, 1915, p. 459.

F. — *Action pathogène*

1° *Action naturelle*. — Habituellement saprophyte de l'intestin, pendant longtemps considéré comme banal, il peut, dans certaines circonstances, devenir pathogène.

On appelle *Colibacilloses*, l'ensemble des maladies qu'il peut engendrer, et elles sont très nombreuses, ainsi que le tableau suivant l'indique :

Appareil digestif :

Angines, Amygdalites ;

Certaines dysenteries ;

Entérite des nourrissons ;

Choléra infantile ;

Choléra nostras ;
Choléra herniaire ;
Appendicites ;
Péritonite par perforation ;
Péritonite sans perforation (Malvoz) ;
Angiocholites suppurées (Charrin et Roger) ;
Absès du foie ;
Ictères infectieux (Girode) ;
Absès abdominaux, etc...

Appareil urinaire :

Infection urinaire (Krogus, Achard) ;
Cystites, Pyélites, Néphrites, etc. (H. Vincent).

Appareil génital :

Salpingites ;
Métrites.

Appareil respiratoire :

Broncho-pneumonies ;
Pleurésies ;
Thyroïdites.

Appareil circulatoire :

Endocardites aiguës (Gilbert et Lion) ;
Péricardites ;
Phlébites ;
Septicémie.

Système nerveux :

Méningites.

Appareil locomoteur :

Ostéomyélite, Ostéite ;
Arthrites.

Tissu cellulaire :

Phlegmons, Phlegmons gazeux.

Une fois devenu l'agent d'une infection, surtout des entérites, il peut avoir acquis une virulence suffisante pour être dangereux vis-à-vis d'organismes sains.

Il se répand rapidement dans le sang, après la mort.

2° *Action expérimentale.* — L'inoculation du colibacille au cobaye, au lapin, à la souris, etc., produit exactement les mêmes symptômes que celle du B. d'Eberth.

G. — *Toxines*

La culture filtrée est toxique (Malvoz), le précipité par le sulfate d'ammoniaque est toxique.

H. — *Immunisation*

L'immunisation est assez facile à opérer. On peut inoculer des doses progressives de cultures virulentes ou de toxine.

Rodet a (1896-1905) immunisé de gros animaux (cheval, mouton) par inoculation progressive de cultures vivantes ou tuées.

Le sérum anticolibacillaire serait immunisant contre le B. d'Eberth, tandis que le sérum de cheval antityphique ne serait pas immunisant contre les colibacilles.

I. — *Diagnostic bactériologique*

Le colibacille ne prend pas le Gram.

CHAPITRE II

Revue générale des principaux procédés

On sait que l'analyse bactériologique qualitative de l'eau se réduit, la plupart du temps, à la recherche du colibacille. Ce microbe, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, se trouve dans l'eau, toutes les fois que cette dernière a été souillée par des matières fécales, du purin, du fumier, etc., et le nombre de colibacilles qu'on y décèle donne approximativement la mesure de la **pollution**.

La recherche de ce microbe est classique et facile, mais, quel que soit le procédé que l'on emploie, il faut toujours isoler le microbe et en rechercher les caractères d'identité, si l'on veut avoir le droit d'affirmer la présence du colibacille. Que l'on utilise les procédés de Chantemesse et Widal, de Préré, de Parietti ou de Vincent, le fait que des microbes végètent dans les milieux phéniqués utilisés par ces méthodes, ne permet pas une affirmation précise : il faut isoler un échantillon microbien et l'identifier. Si l'on utilise la méthode

au rouge neutre, suivant les indications de Stokes, Braun, etc., il en est de même. Il faut donc un certain temps pour avoir un résultat, d'autant plus que l'identification se complique de la présence de colibacilles atypiques et de para-colibacilles, dont le nombre est considérable.

1^o *Procédés par la température*

Ce procédé, très simple, a été indiqué par Rodet, en 1889. Il utilise ce fait que, seuls ou à peu près, le colibacille et le bacille d'Eberth, parmi les microbes des selles ou des eaux, végètent à la température de 45 degrés.

On ensemence quelques ballons de bouillon, on les place quarante-huit heures dans une étuve à +44°5. Au bout de ce temps, si les ballons sont troubles, il y a de fortes présomptions pour que l'on ait affaire à du colibacille.

Eijkmann, en 1904, propose d'ensemencer 1 centimètre cube d'eau dans 10 centimètres cubes de solution peptonée, glucosée et de mettre à l'étuve à 46 degrés.

S'il y a du colibacille, en vingt-quatre heures le glucose fermente et il y a production de gaz.

Cependant, en 1913, Bornaud, étudiant cette méthode, trouve qu'elle n'est applicable que lorsque l'infection de l'eau est récente. Les colibacilles ayant séjourné un certain temps (quatre mois et demi dans le cas particulier) à des températures basses (5, 7, 18 degrés) s'y adaptent et, dès lors, on ne pourrait les faire multiplier à 46 degrés.

2° *Milieux phéniqués*

Les différents procédés reposent sur une des propriétés fondamentales du colibacille.

a) *Procédé de Chantemesse et de Widal*

On ajoute 4 à 5 gouttes d'une solution d'acide phénique à 1/20 par centimètre cube de gélatine; on coule en tubes. On fait des cultures en boîtes de Pétri ou en tubes d'Esmarch. L'acide phénique fait une sélection; la plupart des microbes autres que le B. d'Eberth et le colibacille ne végètent pas.

b) *Procédé de Vincent (1890)*

Procédé de choix. Vincent a combiné l'acide phénique et l'action de la température.

Voici la technique définitive de Vincent :

1° Dans cinq tubes contenant chacun 10 centimètres cubes d'eau peptonée (1 p. 100) et salée (0,5 p. 100), on verse successivement, et à l'aide d'une pipette jaugant par exemple XX gouttes au centimètre cube, I goutte, II gouttes, V, X, XX gouttes à analyser.

2° Dans deux autres tubes plus larges, et renfermant chacun 20 centimètres cubes d'eau peptonée, on verse 2 centimètres cubes et 5 centimètres cubes de la même eau.

3° Dans cinq petits ballons ou fioles de Vivien stérilisés, on verse successivement 10 centimètres cubes, 20, 50, 100 et, au besoin, 200 centimètres cubes d'eau à analyser (on peut utiliser les flacons eux-mêmes dans lesquels l'eau a été expédiée). Pour l'ensemencement de ces plus grandes quantités d'eau, il est plus simple

d'enrichir directement chaque dose d'eau en lui ajoutant une certaine quantité de solution peptonée et salée concentrée.

Vincent emploie la solution stérilisée suivante, qui est parfois un peu trouble, mais qu'il est inutile de filtrer :

Peptone sèche de Witte.	50	grammes
NaCl	25	—
Eau distillée.....	100	—

Le mélange de milieu nutritif concentré et d'eau à analyser doit être tel que le taux de la peptone qu'il renferme soit égal à environ 1 pour 100.

Par exemple, dans le ballon ayant reçu 50 centimètres cubes d'eau, on ajoutera 1 centimètre cube de la solution mère nutritive.

Pour permettre l'isolement du colibacille, ce mélange doit être additionné d'acide phénique destiné à limiter la multiplication des autres bactéries.

Pratiquement, on obtient un titre phéniqué convenable en laissant tomber, à l'aide d'une pipette jaugant environ XXX gouttes au centimètre cube, une goutte de solution phéniquée à 5 p. 100 pour deux centimètres cubes de mélange d'eau et de solution peptonée concentrée. Dans l'exemple ci-dessus (50 centimètres cubes), il faudra ajouter XXV gouttes de solution phéniquée.

Étiquetter, agiter et mettre à l'étuve, réglée à 41°5, tous les tubes et ballons ainsiensemencés.

Si tous les tubes et ballons examinés le lendemain matin sont restés clairs ou s'ils sont à peine louches, on peut conclure que l'eau aux dosesensemencées ne

renferme pas de colibacille. Ce dernier microbe trouble, en effet, très nettement le bouillon phéniqué, à l'encontre de quelques bactéries qui peuvent exceptionnellement pousser dans ce milieu, à cette température.

Lorsque la culture en bouillon phéniqué et à 41°5 est nettement troublée, on réensemence en bouillon simple, ceux des tubes ou ballons qui se sont ainsi troublés. S'il s'agit du colibacille, sa rapidité de multiplication est telle que, dès 4 à 5 heures après, ce réensemencement donne une culture déjà évidente, et qui commence à présenter ses ondes soyeuses. On l'examine à l'état frais et on l'identifie par les moyens ordinaires.

Le dénombrement des colibacilles se fait facilement comme il suit : Supposons, par exemple, que les tubes ensemencés avec I, II et V gouttes d'eau soient restés clairs et que le tube ayant reçu X gouttes (un demi-centimètre cube), ainsi que les suivant, aient été troublés par le B. Coli, il en résulte qu'il existe un exemplaire de ce dernier microbe dans un demi-centimètre cube, soit 2.000 par litre.

c) *Procédé de Péré (1891)*

Péré se sert aussi de l'acide phénique ; mais au lieu d'ensemencer l'eau en petites quantités dans un bouillon phéniqué, il transforme un certain volume d'eau en un milieu nutritif et phéniqué. De cette façon le Colibacille et le B. d'Eberth ne peuvent échapper.

On met dans un matras stérilisé d'un litre : 150 centimètres cubes de bouillon peptoné, 6 à 700 centimè-

tres cubes d'eau à analyser, et 20 centimètres cubes d'une solution phéniquée à 5 pour 100.

On répartit le tout dans 10 ballons stérilisés et on porte ceux-ci à une température qui peut varier entre $+32^{\circ}$ et $+36^{\circ}$ (à $+34^{\circ}$ en moyenne). Le trouble ne se produira pas ou se produira d'autant plus rapidement que la pollution est plus forte (douze à trente heures). Dès que le trouble est évident, on prélève de la semence pour fertiliser du bouillon normal et du bouillon phéniqué. On fait ainsi trois passages en bouillon phéniqué pour avoir le colibacille à l'état de pureté, car les autres espèces périssent pendant ces passages.

d) *Procédé de Parietti*

Se basant sur ce fait qu'une forte dose de semence de bacille typhique peut triompher d'une solution phéniquée qui stérilise une petite quantité de culture. Parietti prépare des tubes de bouillon de 10 centimètres cubes dans lesquels il ajoute 3, 6 et 9 gouttes (chaque goutte équivaut à $1/30$ de centimètre cube) d'une solution préparée d'avance, ainsi composée :

Acide phénique	5	grammes
Acide chlorhydrique . .	4	—
Eau distillée	100	—

Ces tubes sontensemencés par série avec une, deux, trois, etc... gouttes d'eau à analyser. Les eaux sans bacilles typhiques ne troublent, au bout de quarante-huit heures, que les bouillons renfermant peu d'acide phénique et beaucoup d'eau. Au contraire, le colibacille ou le B. d'Eberth amènent un trouble en vingt-quatre heures.

3° *Milieux lactosés*

Le lactose a été choisi pour la recherche du *B. coli* dans le lait, à la place du glucose, parce qu'il existe dans le lait d'autres microbes que le *B. coli* qui font fermenter le glucose avec production de gaz.

E. R. Stitt, de Londres, procède comme suit pour ses analyses d'eau :

a) *Procédé de Race*

Pour l'examen du lait en vue de la recherche du colibacille, J. Race recommande un milieu contenant :

0 gr. 8 pour 100 de lactose,

3 à 4 gr. pour 100 de peptone,

0 gr. 6 pour 100 de chlorure de potassium et de réaction légèrement acide.

On fait avec le lait expertisé des dilutions telles que les quantitésensemencées soient de 0 cc. 001, 0 cc. 01, 0 cc. 1, etc.. La culture des tubes contenant des gaz est repiquée pour identification sur milieux solides (Rebipelagar), mais dans la pratique, et si l'on s'est servi de tubes à fermentation, on pourra se contenter de considérer comme positifs les tubes montrant plus de 5 pour 100 de gaz dans la branche fermée du tube.

b) *Méthode Steward*

Dans les essais de présomption pour déceler le *B. coli* dans l'eau et le lait, Anglais et Américains emploient beaucoup le bouillon de bile lactosé (tube L. B. B.) dont le principe remonte à Jackson et Muer (1906), et qui est aussi à la base de la méthode française Grysez et Pierret.

Le milieu L. B. B. se prépare en ajoutant 1 gramme pour 100 de peptone et 1 gramme pour 100 de lactose et de la bile de bœuf fraîche.

Les tubes contenant du *B. coli* montrent le plus souvent des gaz au bout de quarante-huit heures, mais il est bon d'aller jusqu'à soixante-douze heures.

Race reproche à cette méthode d'empêcher la croissance de nombreuses variétés qu'il estime encore vigoureuses du *B. coli* ; pour éviter ce reproche, on doit faire des dilutions telles que la méthode n'est plus pratique.

c) *Méthode au violet de gentiane*

Joan C. Hall et Lillian Jordan Ellefson, de l'Université de Californie, montrant, après Creel (1914), que beaucoup d'anaérobies donnant des spores, contenus dans l'eau et dans le lait, peuvent donner des gaz aux dépens du lactose, et venir ainsi fausser les essais de présomption pour le *B. coli*, veulent éliminer ces organismes en ajoutant au bouillon lactosé du violet de gentiane dans la proportion de 1 pour 100.000 à 1 pour 20.000. Les cultures de tous les tubes montrant une bulle de gaz ou plus sont repiquées sur gélose lactosée-tournesolée, contenant 1 pour 100.000 de violet de gentiane.

Cette méthode élimine la plupart des aérobies faisant fermenter le lactose et beaucoup d'aérobies ou anaérobies prenant le Gram et ayant la même action sur ce sucre. Elle restreint ainsi le champ d'investigations du *B. coli*.

Si l'on veut l'appliquer au lait, ces auteurs recom-

mandent d'ensemencer dans 20 centimètres cubes de bouillon 1 centimètre cube de lait, au lieu de 10 centimètres cubes d'eau.

Elle élimine du lait les cocci qui font fermenter le lactose avec gaz et la plupart des streptocoques producteurs d'acide, formant des colonies rouges sur gélose lactosée-tournesolée.

d) *Gélose minérale lactosée de Kufferath*

C'est un bon milieu d'isolement du colibacille, pour le lait comme pour l'eau. Il y pousse abondamment, en colonies crémeuses caractéristiques, alors que les autres germes (certains staphylocoques des eaux et du lait) s'y développent mal, mais il y meurt bientôt. Le *B. coli* y affecte une forme allongée en huit caractéristique.

On prépare ce milieu de façon suivante :

Faire une solution minérale avec :

Eau distillée	200 cc.
Phosphate bipotassique	1 gr. 5
Nitrate d'ammoniaque	20 gr.
Carbonate de soude.....	2 gr.
Sulfate de soude.....	2 gr.
Sulfate de magnésie.....	3 gr.
Sulfate de potasse.....	0 gr. 5

Bien l'agiter, en prélevant 50 centimètres cubes et y ajouter :

Eau de ville	950 cc.
Lactose	15 gr.
Gélose	15 gr.

Passer à l'autoclave pour fondre la gélose. Répartir en tubes, stériliser à 120° pendant vingt minutes.

e) *Méthode de Pegallac*

Dans nombre de laboratoires en Hollande, en vue de déterminer la présence éventuelle d'organismes du groupe coli dans le lait pasteurisé ou dans 1/10 cmc. de lait spécial dit « modèle », on a recours à la méthode dite « Pegallac » qui est la suivante :

Le réactif utilisé est le suivant :

Une solution aqueuse contenant 1 % de peptone, 1/2 % de lactose, 3 % de bile de bœuf, stérilisée par maintien pendant 1/4 d'heure à la température de 100° C. et additionnée de 3 % d'une solution de tournesol. Des fractions de 15 cmc. de cette préparation sont stérilisées dans des éprouvettes, par maintien pendant 1/2 heure, à la température de 100° C. Pour déterminer la présence de colibacilles, dans le lait, on additionne 1 cc. de lait au contenu d'une des éprouvettes, on met le mélange dans un tube à fermentation et on le place pendant 24 heures à la température de 37° C. Si la couleur devient rose ou blanche et qu'il y ait développement de gaz, on considère qu'il y a présence d'organismes du groupe coli.

Lerner examina 998 échantillons de lait pasteurisé et 24 échantillons de lait modèle, tous les échantillons furent examinés non seulement au point de vue de leur réaction à la méthode Pegallac, mais encore par d'autres méthodes, en vue d'y déterminer la présence d'organismes du groupe coli ; c'est-à-dire coagulant le lait, formant de l'indol, réduisant le rouge

neutre et produisant du gaz dans des solutions aqueuses de glucose et de peptone et de lactose et de peptone ; caractères, que doit posséder un organisme pour que d'après Lerner il puisse être considéré du groupe coli.

Lerner appliqua au lait la réaction de l'indol préconisée par Gersbach, pour déterminer la présence d'organismes du groupe Coli dans l'eau. Il prépara une solution aqueuse, dont un litre contenait 10 gr. de peptone, 10 gr. de chlorure de sodium et 250 mgr. de bicarbonate de soude. 1 cc. de lait fut additionné à 9 cc. de la solution ; de cette dilution à 1/10, 1 cc. fut additionné à 9 cc. de la solution, de façon à obtenir des dilutions de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 du lait dans la solution. Après maintien à 37° C. pendant 24 heures, la présence éventuelle d'indol fut déterminée selon Ehrlich (indol α : paraméthylamidobenzaldéhyde 2 gr., alcool à 96 % 190 cc. et HCl à 25 % 40 cc. indol β solution saturée de persulfate de calcium).

Généralement, il n'y eut pas la réaction de l'indol dans la dilution à 1/10 même en présence de colibacilles, probablement il y eut inhibition de sa formation, pour laquelle Lerner implique, soit la coagulation des constituants du lait, soit la présence de lactose. Toujours lorsqu'il y eut réaction de l'indol, la présence d'organismes du groupe coli fut constatée par cultures dans du bouillon acide, sur plaques d'Agar d'Endo, etc...

Lerner est d'avis que la réaction de l'indol doit être négative pour du lait « modèle » et du lait pasteurisé

à la dilution de 1/100, que pour du lait ordinaire, elle est presque toujours positive à la dilution de 1/100, parfois encore à celle de 1/1000 ; qu'elle est encore positive pour des laits de mauvaise qualité, récoltés dans de mauvaises conditions, à des dilutions de 1/10000 et encore souvent de 1/100000.

Lerner émet la conclusion : que la réaction de l'indol, appliquée comme il le prescrit, permet de décider en 24 heures de temps, si du lait, dit « modèle » a été récolté dans les conditions de propreté requises, et si du lait pasteurisé a été chauffé à une température suffisamment élevée, pendant un espace de temps suffisamment long.

f) *Gélose de Drigalski-Conradi au Krystall-violet*

Ce milieu se prépare au moyen de quatre solutions suivantes :

Solution N° 1. — Faire macérer 1.500 grammes de viande de bœuf, à froid, pendant 10 heures, dans deux litres d'eau. Coction d'une heure et filtration.

Ajouter le mélange suivant :

Peptone de Witte.....	20 grammes
Nutrose	20 —
Sel marin	10 —

Nouvelle coction d'une heure, filtration et addition de 60 grammes de gélose. Séjour à l'autoclave pendant une heure, alcaliniser légèrement, filtrer, faire bouillir pendant une demi-heure.

Solution N° 2. — Dissoudre 3 grammes de lactose dans 300 centimètres cubes de teinture de tournesol. Faire bouillir pendant 10 minutes.

Ajouter à la solution N° 1, encore chaude et liquide, la solution N° 2 lactosée et tournesolée.

Solution N° 3. — Solution de soude à 10 pour 100 stérilisée, et ajoutée au mélange précédent, dans la proportion d'au moins 4 centimètres cubes.

Solution N° 4. — Ajouter enfin 20 centimètres cubes d'une solution de Krystall-violet et à 0 gr. 10 pour 100 d'eau distillée. Couler en tubes ou en boîtes de Petri.

Le bacille d'Eberth et les bacilles paratyphiques donnent des colonies incolores, celle du colibacille sont rouges. Le Krystall-violet aurait l'avantage d'empêcher le développement des germes associés aux bacilles typhiques et paratyphiques et au colibacille.

g) Gélose fuchsiné d'Endo

La gélose fuchsinée, additionnée de sulfate de sodium, est décolorée. Les acides sécrétés par le colibacille recolorent (colonies rouges en vingt-quatre heures) les colonies de B. d'Eberth restent incolores.

Ce milieu se prépare au moyen suivant :

Dissoudre 30 grammes de gélose dans un litre de bouillon. Filtrer. Neutraliser. Ajouter 10 centimètres cubes de solution de bicarbonate de soude à 10 pour 100. 10 grammes de lactose et 5 centimètres cubes de solution saturée et filtrée de fuchsine. Ajouter : 25 centimètres cubes de solution récente de sulfate de sodium (10 pour 100). Stériliser à +115 degrés.

C'est le meilleur milieu pour la recherche dans les selles ; mais de préparation délicate.

h) *Gélose métachrom-jaune de Gassner*

Le milieu de culture est le suivant :

Pour 1000 cmc. d'agar de culture chaude, on ajoute 62,5 cmc. d'une solution aqueuse de métachrom-jaune (n R. D.) qui a bouilli pendant 2 minutes.

On dissout dans 87,5 cmc. d'une solution aqueuse à 1 % de Wasserblau (6 B. extra P. de Agfa), 50,0 gr. de lactose et l'on porte à l'ébullition pendant 10 minutes. Cette solution est ajoutée à l'agar de culture chaude, qui a été traité par le métachrom-jaune ; bien mélanger, verser dans un flacon d'Erlenmeyer de 200 cc.

Prélever le germe.

L'ébullition des diverses solutions de coloration se fait séparément pour éviter la précipitation.

i) *Agar au bleu de chine et au vert malachite (Bitter)*

On porte à l'ébullition pendant quelques minutes 1000 cmc. d'agar de culture additionnés de 20,0 gr. de lactose. A 100 cmc. d'agar chaud, on ajoute 9 gouttes d'une solution aqueuse de bleu de chine (Höchst) et 2,5 cmc. d'une solution de vert malachite à 0,1 % (Krist extra Höchst). Verser dans un flacon une quantité déterminée. Après culture, effectuer la recherche et le prélèvement des germes.

4° *Milieux à l'esculine*

L'esculine est un glycoside, extrait du marron d'Inde. Sous l'influence de certains ferments, il se dédouble en glucose et en esculétine, diphénol complexe, qui, en présence de citrate ferrique, produit une

coloration brune ou noirâtre selon la réaction du milieu. L'addition de glucose au milieu empêche la réaction.

C'est sur cette réaction qu'est basé l'emploi du milieu à l'esculine pour déceler le colibacille. Cette bactérie, ainsi que le bacillus lactis aërogène (très voisin et ayant la même signification) provoquerait la fermentation de l'esculine, qui en présence du sel de fer donne la coloration noire.

Deux milieux peuvent être employés, le milieu liquide et le milieu solide.

Harrison et Van Der Leek proposent un milieu ayant la composition suivante :

Peptone de Witte.....	1 %
Sels biliaires	2,5
Esculine	1
Citrate de fer	0,05
Eau	100 cmc.

Quant au milieu solide, il est ainsi préparé :

Dissoudre dans 100 centimètres cubes d'eau, 1 gr. de peptone de Witte, 0 gr. 25 de sels biliaires, 1 gr. 50 à 2 gr. de gélose.

Neutraliser avec un alcali.

Coaguler avec du blanc d'œuf et filtrer. Ajouter : 0 gr. 20 de citrate de fer, 0 gr. 10 d'esculine. Cette quantité doit donner une légère acidité et produire un peu de fluorescence de milieu.

Le milieu solide noircit de façon plus énergique que le milieu liquide. Autour des colonies surtout, on observe une teinte brune très foncée.

Des recherches effectuées par Rochaix sur l'eau et

sur le lait, la réaction est en défaut dans la proportion du tiers des cas environ.

En somme, les milieux à l'esculine ne permettent pas d'obtenir avec le colibacille une réaction suffisamment constante, pour constituer un caractère bio-chimique de réelle valeur. Son emploi se montre très inférieur aux méthodes classiques.

5° *Milieux au rouge neutre*

Principe. — Historique. — Manuel opératoire

L'emploi du *rouge neutre* pour la recherche du colibacille dans les eaux a été préconisé en 1898 par Rothberger.

En la même année Rothberger découvre la propriété du colibacille de faire virer la gélose colorée au rouge neutre au jaune canari avec fluorescence verte. Le caractère étudié par Scheffler, Kohler, Wolff, Oldekop et Savage est aujourd'hui classique ; on n'oublie jamais de la rechercher pour identifier le colibacille. En 1902, Gèzes, étudiant ce procédé sur diverses espèces de colibacille, fait la remarque importante que la température n'influe pas sur la réaction du rouge neutre, donnée par le colibacille. En 1904, Stokes s'applique à la recherche directe du colibacille dans les eaux. Braun, en 1906, se fait le défenseur ardent de cette méthode. Lacomme l'associe à la méthode d'Eijkmann en portant le milieu à la température de 45-46°, qui permet la végétation du colibacille et du Bacille d'Eberth, en éliminant un grand nombre d'autres germes ne pouvant végéter à cette température.

Causes d'erreur

Nombreux auteurs font remarquer que la réaction n'est pas spécifique et que beaucoup de microbes autres que le colibacille, sont capables de donner une réaction positive.

Rothberger signalait déjà, en 1898, que le bacille du tétanos et celui de l'œdème malin peuvent donner une fluorescence verte sur les milieux au rouge neutre.

Scheffler en 1900, retire des matières fécales huit variétés de germes, et des eaux trois variétés pouvant rendre fluorescent le milieu au rouge neutre.

Hunter, en 1901, indique que le *Bacillus entéritidis* de Gaertner, le *B. tétanique* et le bacille du charbon donnent une réaction positive.

Segale, en 1908, constate que certains paratyphiques font virer le rouge neutre.

Ferrera, Horta et Paredes ont constaté le virage du rouge neutre avec le *bacillus cloacæ*.

Rochaix, en 1909, montre que le *bacillus subtilis* donne une belle fluorescence verte, mais sans passage de la coloration rouge primitive au jaune canari.

Sicre, la même année, donne une liste de microbes faisant virer le rouge neutre : « *B. pyocyanique*, *B. fluorescent putride*, *Bacille paratyphique B.* (Schotmuller, Sacquepée) le *B. de Gaertner*, le *B. enteritidis* ».

Il remarque que ces germes ne donnent pas toujours avec une absolue netteté la teinte jaune canari que provoque le bacille type.

Il ajoute que le *B. mésentérique* et le *B. subtilis* donnent en bouillon au rouge neutre une teinte jaune

pâle sans fluorescence, commençant à se produire dans les zones superficielles et en gagnant que tardivement les zones profondes du liquide de culture.

Vincent critique vivement la méthode pour la recherche du colibacille et assure que dans 5 pour 100 des cas avec des eauxensemencées en faible quantité (10 cc.) la fluorescence ou la teinte jaune peuvent ne pas être dues au colibacille.

Rochaix et Dufourt, en 1911, isolent d'urines et de purin six bacilles et deux microcoques qui donnent à la fois le jaune canari et la fluorescence verte.

Comme on le voit, le colibacille n'est pas le seul microbe donnant la réaction et les critiques formulées plus haut ne tendent à rien moins qu'à dénier toute spécificité à cette réaction. Mais si parmi les faits avancés, il s'en trouve d'exacts, d'autres sont erronés ou observés d'une façon imprécise. La connaissance du mécanisme de la réaction et des conditions dans lesquelles elle doit être réalisée est nécessaire pour comprendre les faits et établir les distinctions nécessaires.

Mécanisme de la réaction :

Le mécanisme de la réaction du rouge neutre a été élucidé par les travaux de Rochaix et Dufourt, d'une part, de Guerbet, d'autre part.

Le rouge neutre, très employé en teinture, est, comme on sait, un chlorhydrate de diméthyldiaminotoluphénazine symétrique, répondant à la formule:



Ce corps, soluble dans l'eau, lui communique une coloration rouge rubis.

Sous l'influence des alcalis, de l'ammoniaque en particulier, la base du rouge neutre est mise en liberté. Cette substance donne une coloration jaune orangé en solution aqueuse.

Si l'on fait agir sur le rouge neutre des réducteurs, tels que l'hydrogène naissant, en solution acide, le liquide devient rouge groseille, en même temps qu'apparaît une légère fluorescence verte, visible par réflexion.

En solution alcaline, les réducteurs transforment le rouge neutre, en son hydrobase par rupture du noyau azoté de la phénazine; le corps obtenu donne, en solution aqueuse, une coloration jaune serin par transparence, avec fluorescence verte par réflexion.

Il est d'ailleurs facile de produire cette réaction : on place dans un tube à essai 10 centimètres cubes d'eau, additionnée de X gouttes de solution de rouge neutre à 25 pour 100. On ajoute quelques parcelles de limaille de zinc et une dizaine de gouttes d'acide acétique ou lactique. Ce mélange est légèrement chauffé : un dégagement d'hydrogène apparaît. En continuant à chauffer, le dégagement devient régulier et abondant ; la coloration rouge, légèrement violacée, qu'a prise le rouge neutre sous l'influence de l'acidification, passe au rouge rubis, puis au rouge brique. On voit, en même temps, apparaître une fluorescence verte, qui va s'accroissant au fur et à mesure que la réduction se produit.

Sous l'influence de la réduction, un des deux élé-

ments de la réaction, la fluorescence verte, est apparue. A ce moment on décante la liqueur pour la séparer du zinc et on ajoute, goutte à goutte, un alcali, ammoniacal ou potasse. La teinte rouge brique fait place à une teinte orangée, puis à une teinte jaune canari, quand l'alcali est en excès.

En même temps, la fluorescence augmente, jusqu'à ce que l'excès d'alcali dissolve le précipité gélatineux d'oxyde de zinc. La fluorescence est exagérée par la présence du précipité gélatineux. (Dans les cultures, la présence des bactéries joue le rôle du précipité, en augmentant la fluorescence.)

La réaction est alors complète : coloration jaune canari par transparence avec fluorescence verte par réflexion.

Elle est due, comme on l'a vu, à la réduction du rouge neutre en milieu alcalin.

Dans les cultures de colibacille en bouillon au rouge neutre, le mécanisme est le même.

Nous savons que le colibacille est un réducteur puissant. Cassedebat a montré son pouvoir réducteur sur la chrysoïdine, la fuchsine, le vert brillant, le violet de gentiane; le bleu de méthylène; Wurst, sur le tournesol; Elsner, sur l'hydroquinone; Wolf, sur l'orcéine; Buchholz, sur l'orseille; Guth, sur l'alizarine; Frégonneau, sur le méthylorange; Scarzella, sur plus de trente-quatre matières colorantes, etc... Le colibacille réduit le rouge neutre au même titre que les substances précédentes, et il possède vis-à-vis de cette substance une affinité particulière, alors que beaucoup d'autres bactéries, cependant réductrices, restent sans action sur elle.

D'ailleurs, la fluorescence dans les cultures aérobies disparaît assez rapidement, l'oxygène de l'air agissant sur la matière colorante, alors que dans les cultures anaérobies la réaction persiste très longtemps. Cette dernière observation confirme le rôle du phénomène de réduction dans la production du virage des cultures de colibacille en bouillon au rouge neutre.

Quant au second élément de la réaction, le virage au jaune canari, il est sous l'influence de l'alcalinité, dû à l'apparition momentanée d'ammoniaque dans les cultures. Cependant, cette condition n'est pas suffisante, ainsi que le montre Guéret; il faut, pour obtenir le virage complet, l'intervention des phénomènes réducteurs. Sous l'influence de l'alcalinité seule, on n'obtient souvent qu'une coloration jaune brique.

L'intervention du pouvoir réducteur du bacille est démontrée par les faits suivants :

1° On sait que la réaction du rouge neutre en aérobie, même quand elle s'est présentée avec toute sa netteté, disparaît assez rapidement. La fluorescence disparaît d'abord, cette disparition indique que les processus de réduction sont terminés et que l'oxygène de l'air influe sur la matière colorante. En même temps que la fluorescence s'atténue, la coloration jaune canari tend à virer au jaune rougeâtre. Dans une culture de colibacille, vieille de huit jours, il ne reste plus qu'une coloration pelure d'oignon. Cependant, au début de la culture, le virage au jaune canari s'est produit alors qu'il n'y avait pas d'ammoniaque libre en apparence dans la culture (il s'en forme cependant des traces qui sont suffisantes pour aider les

phénomènes de réaction) ; d'autre part, la teinte jaune disparaît, malgré les proportions croissantes d'ammoniaque, en même temps que le pouvoir réducteur des bactéries s'atténue.

2° Prenons une culture anaérobie (de trois jours) de colibacille, ouvrons le tube et agitons-le à l'air ; en l'espace de quelques minutes, sous l'influence de l'oxygène de l'air, la fluorescence disparaît et la teinte jaune canari fait place à une teinte jaune rougeâtre. C'est cette teinte rougeâtre qui correspond à l'action de l'ammoniaque seule sur le rouge neutre.

Quelle est l'origine de l'ammoniaque ? L'accord n'est pas fait sur ce point.

En somme, bactériologiquement, la réaction complète (virage au jaune canari avec fluorescence verte) est sous la dépendance des mêmes facteurs que la réaction effectuée avec des solutions chimiques.

Nous insistons sur les deux éléments de la réaction :

1° fluorescence verte ;

2° virage au jaune canari.

Nous verrons plus loin l'importance de cette distinction, pour éviter les erreurs.

Rôles des sucres dans la réaction :

Divers auteurs ont préconisé, les uns l'addition de glucose, les autres l'addition de lactose, dans le bouillon au rouge neutre. La présence de ces sucres permettrait la formation de gaz dans les cultures, sous l'influence de l'action fermentative du colibacille et constituerait un caractère diagnostique qui viendrait s'ajouter à celui tiré du virage du rouge neutre.

Braun, Jaromir-Bulir, Lacomme ont préconisé l'addition de sucre divers dans ce but.

Mais la présence des sucres, si elle permet de surprendre la formation de gaz dans les cultures, gêne considérablement le virage du milieu au jaune canari avec fluorescence verte.

Segale, de Gênes, en 1908, avait déjà critiqué la présence des sucres dans le milieu de Savage ; il avait constaté que l'acidité produite dans l'attaque du sucre par le colibacille empêche souvent la réaction.

Rochaix a d'ailleurs vérifié le fait expérimentalement par une série de recherches du colibacille dans l'eau, comparativement, en milieu au rouge neutre sucré (glycose ou lactose) en milieu non sucrés. Les races à fonction acidogène accusée n'ont pas été décelées par le bouillon au rouge neutre sucré, alors que dans les bouillons non sucrés, on obtenait des résultats positifs. L'isolement des colibacilles de milieux phéniqués (procédé de Vincent) servait d'expérience, témoin.

Guerbet, qui s'est aussi préoccupé de la question, a fait aussi des expériences en aérobie et en anaérobie. d'où il résulte que l'acidité des cultures, c'est-à-dire la présence de sucres fermentescibles, est nuisible à la réaction en aérobie. Par contre, ce même auteur a montré qu'en présence de glucose, l'apparition de l'acidité est retardée par l'anaérobiose. On pourrait donc, dans ce cas, utiliser, comme élément de diagnostic, à la fois la production de gaz due à la fermentation des sucres et le virage du milieu. Mais, si l'on pratique, comme on le fait d'ordinaire, les cultures

en aérobie, il est de toute nécessité de supprimer les sucres qui gênent ou empêchent le virage.

La connaissance de tous ces faits nous permet maintenant de nous expliquer les résultats contradictoires obtenus par les bactériologistes cités précédemment.

Il est d'abord toute une catégorie de microbes qui ne donnent qu'un virage incomplet, un seulement des deux éléments de la réaction : la fluorescence verte. C'est le cas du *B. tétanique*, du *B. de l'œdème malin*, du *B. pyocyanique*, du *B. subtilis*, *B. Mésentericus vulgatus* ou *niger*, du *B. fluorescens* et la liste pourrait être considérablement allongée. On ne peut pas dire qu'ils donnent une réaction positive.

D'autre part, tous les microbes capables de produire des phénomènes de réduction en milieu alcalin, produiront le virage caractéristique avec ses deux éléments, fluorescence verte et coloration jaune canari.

C'est le cas du colibacille des paratyphiques A. et B., et des microbes qui se rattachent à ce dernier : *B. enteritidis* de Gaertner, *B. d'Aertryck*, du *Hog-choléra*, de la *Psitacose*, *B. typhi-neurium*, etc...

Si certains auteurs, comme Lacomme pour le *B. enteritidis* de Gaertner et le *B. de Schottmüller* (para B), Babes et Feodorasco pour le paratyphique B., Roussel pour le paratyphique A., Vincent, Sicre Mandoul et Gruat et d'autres auteurs pour certains colibacilles, n'ont pas obtenu une réaction positive avec ces microbes, c'est qu'ils ont opéré en milieux sucrés, comme nous l'avons vu nous-même dans notre étude comparative citée plus haut.

En outre, comme nous l'avons dit précédemment,

Rochaix et Dufourt ont isolé du purin et du fumier un certain nombre de microbes de la fermentation ammoniacale, qui donnent la réaction complète du rouge neutre. Ils ont montré les relations qui unissent ces deux propriétés et vraisemblablement c'est parce qu'il est un microbe de la fermentation ammoniacale, ainsi que l'ont démontré depuis longtemps déjà Halle et Dissard, que le colibacille donne la réaction. Il en est de même pour le paratyphique A. et tout le groupe des Salmonelloses.

Il paraît donc acquis que la réaction du rouge neutre est l'apanage de microbes des matières fécales, du purin, du fumier, que le colibacille est loin d'être la seule espèce microbienne capable de donner la réaction complète, mais que les autres espèces, donnant aussi la réaction positive, ont la même signification au point de vue de la contamination de l'eau. (Dans son *Traité de Bactériologie*, t. II, p. 810, le Professeur Macé exprime déjà cette opinion.) Un échantillon d'eau ensemencé en bouillon au rouge neutre et donnant la réaction positive, sera considéré comme contaminé non pas seulement par le colibacille, mais par d'autres microbes provenant des matières d'origine intestinale. L'indice de la contamination de l'eau ne sera plus le colibacille seul, mais l'ensemble des microbes faisant virer le rouge neutre. Point ne sera besoin, dans ce cas, d'isoler le colibacille de l'eau pour affirmer la contamination, le virage complet du bouillon au rouge neutre, à la suite de l'ensemencement d'un échantillon d'eau suffira.

Procédés au rouge neutre

a) *Précédé de Rothberger* modifié par Savage :

On fait bouillir 125 grammes de viande de bœuf dans 500 centimètres cubes d'eau, et on ramène à 500 centimètres cubes. On filtre et on ajoute :

Peptone Dufresne 10 grammes

Sel marin..... 10 —

Glucose 2 gr. 60

On fait bouillir. On laisse refroidir. On ajoute :

Sol. aqu. de rouge neutre à 5 pour 100.... 5 cc.

On stérilise à 115° pendant 30 minutes et répartit en tubes. Le colibacille fait virer le milieu en 24 heures (48 heures au plus) au jaune canari avec fluorescence verte (bulles gazeuses), le B. d'Eberth ne modifie pas le rouge neutre.

b) *Procédé de Lacomme* :

Lacomme a combiné la méthode au rouge neutre avec celle d'Eijkamann (solution peptonée glycosée) de la coloration verte et fluorescente, et celle de la production des gaz (et de l'acidité).

S'il y a : fluorescence verte (et acidité), on est en présence du colibacille (Bulir).

Voici la technique de Lacomme : Faire à chaud la solution de rouge neutre, filtrer, stériliser et conserver pour s'en servir à froid.

Bouillon :

Eau. 1.000 grammes

Glucose 100 —

Peptone de Witte 100 —

NaCl 50 —

On répartit le bouillon en tubes de 15 centimètres cubes auxquels on ajoute, au moment de les employer, 12 gouttes (pipette à 1/20 centimètre cube) de la solution de rouge neutre.

Chacun de ces tubes (tube de Eijkamann) est destiné à recevoir 100 centimètres cubes d'eau. Ils sont mis à l'étuve à + 45°, 46°.

Il est facile de faire des dilutions de l'eau à analyser pour faire une numération avec ce seul modèle de tubes. La réaction est caractéristique en vingt-quatre heures (production de gaz fluorescence verte).

c) *Jacomir Bulir* : a combiné la méthode de Max-gill-Savage à celle de Eijkamann. Pour cet auteur, la formation de gaz qui sert à déceler le colibacille dans le procédé d'Eijkamann n'est pas spécifique, des gaz pouvant apparaître avec d'autres microbes, alors il a combiné la formation de gaz à 46° avec la formation d'acide et la réduction du rouge neutre.

Voici, résumée, sa technique :

On prépare le bouillon suivant : 1 kilogramme de bœuf finement haché est mis à macérer 24 heures avec 2 litres d'eau ; on prend un litre de cet extrait de viande, on filtre, puis on ajoute 25 gr. de peptone de Witte, 15 gr. de sel, 30 gr. de mannite, on cuit une heure et demie, on neutralise à la soude et on stérilise deux heures à la vapeur. Ce bouillon ainsi préparé on ajoute à deux volumes (100 cc.) de l'eau à analyser, un volume (50 cc.) du bouillon, puis 2 % d'une solution stérilisée de rouge neutre à 1/100 dans l'eau distillée. Répartir dans le nombre voulu de tubes à fermentation (15 à 20 cc. dans chaque) ; tenir à l'étuve

à 46°. Pour qu'il y ait réellement du coli, la fluorescence et la production de gaz ne suffisant pas à l'auteur, il faut de plus prendre 10 cc. du contenu de l'eau des tubes à fermentation et rechercher l'acidité à la teinture bleue de tournesol d'alcalinité déterminée. Si l'un des trois facteurs, fluorescence, gaz, acidité, manque, il ne s'agit pas de colibacille vrai.

d) *Procédé de Rochaix :*

Cet auteur a étudié le mécanisme de la réaction du rouge neutre et a montré que le virage au jaune canari et la fluorescence verte sont dus à des phénomènes de réduction en milieu alcalin. Or, la fermentation des sucres aboutit à la formation d'acides. La réaction sera fortement gênée, si elle n'est pas totalement empêchée, quand le milieu au rouge neutre renfermera un sucre (lactose ou lévulose).

Rochaix a d'ailleurs vérifié le fait expérimentalement. Aussi doit-on employer du bouillon au rouge neutre sans sucre. Le milieu à employer est le suivant :

Dans un demi-litre d'eau, on fait cuire 125 gr. de viande de bœuf. La cuisson ne doit pas être prolongée. Après refroidissement on ajoute :

Peptone	10 grammes
Sel marin	10 —

On ramène à 500 centimètres cubes avec de l'eau, on neutralise avec une solution de carbonate de soude jusqu'à neutralité ou alcalinité très légère. On stérilise à l'autoclave à + 120°, pendant un quart d'heure ; puis après refroidissement et repos, on décante avec précaution et on ajoute 5 centimètres cubes de la solution suivante :

Rouge neutre..... 5 grammes

Eau distillée 100 centimètres cubes

On porte à l'autoclave à $+ 115^{\circ}$ pendant une demi-heure.

Il a, d'autre part, dans une série de recherches avec A. Dufourt, montré que la réaction du rouge neutre, appliquée à la recherche directe du colibacille dans l'eau, n'est pas spécifique de ce microbe. Il confirme sur ce point les recherches de Rothberger, Scheffer, Hunter, Sagale, Ferreara, Sicre, Vincent, et apporte de nombreux exemples, en ce qui concerne en particulier les urobactéries ; mais il démontre que la réaction du rouge neutre est pratiquement, en ce qui concerne l'analyse de l'eau, l'apanage des microbes des matières fécales, du purin, du fumier. Si le colibacille est loin d'être la seule espèce microbienne capable de donner la réaction complète, les autres espèces qui donnent aussi la réaction positive, ont la même signification au point de vue de la contamination de l'eau : B. paratyphique A et B, groupe des salmonelloses, *Bacillus cloacae*, microbes de la fermentation ammoniacale, etc...

Il établit ainsi une méthode de recherche de la contamination bactériologique des eaux de boisson basée sur ce principe : l'indice de la contamination de l'eau n'est plus le colibacille seul, mais l'ensemble des microbes faisant virer le rouge neutre. Plus n'est besoin d'identifier un échantillon microbien et de l'isoler, ce qui demande du temps, d'autant plus que l'identification se complique de la présence des colibacilles atypiques et de para-colibacilles, dont le nombre est

considérable. Le virage complet du milieu au rouge neutre, jaune canari avec fluorescence verte à la suite de l'ensemencement d'un échantillon d'eau, suffit.

Une échelle analogue à celle employée pour la colorimétrie permettra d'apprécier le degré de contamination de l'eau d'une façon très rapide, dans les quarante-huit heures. Ce procédé rapide est surtout utile pour la surveillance des eaux.

CHAPITRE III

I. - Le *Bacterium Coli* dans le lait

1. — Sa signification

1° *Dans le lait cru.* — On sait depuis longtemps que le lait de femme bien portante recueilli aseptiquement ne contient aucun microbe.

Du lait de vache recueilli, à l'exception des premiers jets, aussi aseptiquement que possible dans un récipient stérile, la traite étant faite sur des animaux bien pansés, avec des mains propres, après savonnage du pis et essuyage avec un linge propre, n'est pratiquement jamais, en masse, exempt de germes.

Sa flore est peu variée. Elle est constituée de quelques microcoques, liquéfiant ou non, parfois de rares staphylocoques ; le *Bactérium lactis acidis* s'y rencontre aussi, mais pas toujours, et il est peu abondant.

Jamais on ne trouve de micro-organismes du groupe coli-aérogènes. C'est postérieurement à la mulsion que ces derniers viennent ensemençer le lait quand

les précautions les plus élémentaires ne sont pas prises ; ils sont apportés par les poussières du sol et des fourrages, par la malpropreté des récipients, celle de l'homme, celle de l'animal, le mouillage avec des eaux contaminées.

Il est facile, cela étant dit, d'apprécier à sa juste valeur la signification du *B. coli* dans le lait cru.

Puisque le colibacille est un hôte constant du gros intestin de l'homme et des animaux domestiques, qu'il se trouve en abondance dans les excréments de celui-là et de ceux-ci, sa présence dans le lait décèle à coup sûr la souillure de cet aliment par des matières excrémentitielles, et, de plus, elle signifie la possibilité que le lait peut avoir véhiculé à un moment donné des germes pathogènes qui coexisteraient à côté du colibacille.

Quand l'analyse de l'eau permet d'y trouver le bacille typhique, le *B. Coli* accompagne toujours ce dernier ; mais l'inverse n'est pas fatalement vrai.

Une eau dans laquelle on décèle le *B. Coli* est évidemment suspecte, mais elle ne contient pas obligatoirement le *Bacillus typhosus*. *A fortiori*, une eau sans *B. coli* est également sans *B. typhique*.

Ces considérations sont également d'application stricte au lait ; leur importance ne saurait échapper à l'hygiéniste soucieux de procurer du bon lait à l'enfance pour ses débuts.

Aussi la question de la contamination du lait par les matières fécales est-elle du plus haut intérêt, car si le lait est souillé, il est toujours suspect, en attendant qu'il puisse être dangereux.

A l'examen des échantillons de laits provenant des diverses régions qui approvisionnent Paris, Bordas a trouvé chez certains d'entre eux un gramme de matières excrémentitielles par litre et une richesse bactérienne de 20 millions de germes par centimètre cube.

On conçoit que de tels laits, si intensément souillés, d'une pareille richesse microbienne, véritables dilutions d'excréments, soient dangeureux pour le fragile tractus gastro-intestinal des enfants et déclenchent brutalement chez ceux-ci des affections diarrhéiques à forme cholérique d'une extrême gravité. Et encore, nous ne parlons pas du risque, que nous serons tenté de dire presque fatal, que ces laits ont de contenir le bacille tuberculeux. Schroeder et Cotton, dans des expériences célèbres, ont établi que la contamination du lait des bêtes réagissant à la tuberculine et qui ne présentent pas des lésions spécifiques mammaires pouvait souvent se faire indirectement, par la chute dans le lait de matières excrémentitielles chargées de bacilles, régurgités après des efforts de toux. Et quand on sait le danger de la tuberculisation de l'enfant par la voie digestive avec le bacille bovin, on peut à bon droit être effrayé des conséquences tuberculigènes de la pollution du lait par les excréments.

Puisque, comme l'ont montré à Kufferath les essais qu'il a faits, en Belgique, dans les vacheries du Comité National à Nerom et à Boitsfort, dit qu'on ne trouve jamais du *B. Coli* dans les laits proprement traits, la richesse du colibacille s'impose dans l'examen de laits crus afin d'en apprécier la valeur hygiénique.

2° *Dans les laits pasteurisés.* — La présence du

colibacille dans le lait pasteurisé est généralement considérée comme une indication de chauffage insuffisant ou de réinfection après la pasteurisation (1).

Dans le but de vérifier les expériences de de Jong qui avaient établi que le B. Coli et le bacille tuberculeux (2) sont plus résistants à la chaleur dans le lait que dans le bouillon et l'eau, Ayers et Johnson ont chauffé des laitsensemencés de B. Coli à 60 degrés pendant trente minutes : la moitié des souches résista, mais toutes furent tuées après chauffage à 65°6 pendant trente minutes.

Toutefois, disent de Jong et de Graaff, la certitude de tuer tous les colibacilles n'existe qu'avec une pasteurisation à 70-72 degrés pendant trente minutes pas moins.

Pour Whittakere Hall, regrettant récemment la grande marge laissée aux Etats-Unis et au Canada, dans l'interprétation légale du lait pasteurisé, la température de 62 degrés est pratiquement insuffisante.

Elle élimine le B. Coli et beaucoup de microbes ne résistant pas à 60°5, pendant trente minutes, à savoir : le B. typhique, le B. diphtérique, et le B. de Koch. (On sait que pour détruire les spores du B. subtilis il faut pousser jusqu'à plus de 100 degrés.)

(1) Les procédés de pasteurisation se ramènent à deux principaux :

1° On chauffe le lait pendant trente minutes à 63-65 degrés, et on le refroidit rapidement (pasteurisation basse).

2° On chauffe le lait pendant deux à six minutes à 80-90 degrés et on le refroidit rapidement (pasteurisation haute).

(2) Le bacille tuberculeux est trouvé vivant dans la « peau » du lait après chauffage à 50 degrés pendant une heure (Smith).

Ainsi le lait pasteurisé du commerce peut-il présenter des dangers analogues à ceux du lait cru, attendu que, si dans celui-ci les ferments lactiques inoffensifs empêchent les ferments nuisibles, dans le lait pasteurisé les ferments lactiques sont en partie tués en raison de la température à laquelle le lait est porté; aussi ce dernier n'est plus protégé contre la pullulation des bacilles à spores dont certains (Flogge) sont capables de produire des toxines nuisibles.

3° *Dans les laits stérilisés.* — Naturellement, en raison des températures de stérilisation, le B. Coli n'y doit jamais subsister.

2. — Sa recherche

La recherche du B. Coli dans le lait comprend :

1° Des essais préliminaires ou essais de fermentation ;

2° Des recherches bactériologiques qualitatives et quantitatives.

1° Essais de fermentation. — Les ferments lactiques appartenant au groupe coli provoquent presque toujours la formation de gaz ; ils agissent le plus souvent de façon très défavorable sur l'odeur et le goût du lait. On les décèle assez aisément, mais très grossièrement, par l'épreuve dite de fermentation (Löhnir).

On verse dans de gros tubes à essais 50 centimètres cubes de lait et on les porte au bain-marie à 40 degrés. On les examine entre douze à quarante-huit heures. Après douze heures, le lait proprement recueilli n'est pas modifié.

Le lait contenant du *B. Coli* et certains autres germes d'origine excrémentitielles est coagulé. Le caillot plus ou moins soulevé est dilacéré, fragmenté par les gaz dégagés et collectés quelquefois sous forme de bulles assez grosses ; l'odeur n'est pas très agréable.

Au contraire, quand le lait coagule sous l'action des ferments lactiques normaux, son caillot est massif, non déchiqueté, homogène, ferme, gélatineux et l'odeur est agréable.

Kufferath admet que les laits contenant du *B. Coli* et qui ne donnent pas de bulles de gaz à 37 degrés ne sont que faiblement contaminés.

2° Recherche bactériologique du colibacille dans le lait. — Les procédés de recherche sont nombreux et généralement calqués sur ceux qui sont employés pour l'eau ; cependant ils ne conviennent qu'imparfaitement ; ils sont plus longs et moins exacts.

Les hygiénistes se préoccupent en ce moment d'établir la distinction entre les colibacilles d'origine récente et ceux d'origine déjà ancienne que l'on peut rencontrer dans l'eau. En Amérique, les méthodes officielles comportent cette distinction.

En France, le Professeur Rochaix (1925), et son élève Mlle Urtinette, en 1929, ont étudié la valeur des caractères proposés. Les colibacilles d'origine fécale récente présentent habituellement les trois caractères suivants :

Production abondante d'indol.

Réaction de Vos-Proskauer : négative.

Réaction du rouge de méthyle : positive.

Il ne semble pas que, pour le lait, la recherche de ces caractères ait un véritable intérêt. Cet aliment très altérable, aliment exclusif de l'enfant et aliment principal du vieillard et de beaucoup de malades, doit être rigoureusement exempt de tout colibacille, quel qu'il soit, et ainsi à l'abri de toute suspicion.

Recherches personnelles

Application de la méthode du rouge neutre à la recherche du colibacille dans le lait

Les recherches de différents auteurs nous ont amené à la conception d'une méthode de recherche rapide de la contamination bactériologique du lait, au moyen du bouillon au rouge neutre. Pour découverte rapide (48 heures au maximum) de la contamination globale du lait par les microbes provenant de matières d'origine intestinale, humaine ou animale.

Voici la technique de la méthode :

Le bouillon au rouge neutre sera préparé de la façon suivante :

Dans un litre d'eau on fait macérer 250 grammes de bœuf (haché finement) pendant 24 heures ; après, faire bouillir. Ecumer et après refroidissement on ajoute :

Peptone Dufresne.....	20 grammes
Sel marin	20 grammes

On ramène à 1.000 centimètres cubes avec de l'eau, on fait bouillir de nouveau 5 minutes, puis, après refroidissement et repos, on filtre avec du papier de chardin et on ajoute 10 centimètres cubes de la solution suivante :

Rouge neutre	5
Eau distillée	100

On porte à l'autoclave à 115° pendant 30 minutes.

C'est en somme le bouillon de Savage dans lequel on a supprimé la glucose.

Ce bouillon est réparti en une série de tubes de diverses grandeurs, pour faire l'échelle nécessaire à l'appréciation du degré de la contamination.

Les quantités n'ont pas besoin d'être exactement mesurées.

L'échelle sera analogue à celle utilisée dans les méthodes ordinaires de dosage du colibacille.

La préparation du bouillon au rouge neutre a été exposée maintes fois, mais nous attirons l'attention sur les soins minutieux qui doivent être apportés dans sa préparation. Le rouge neutre doit être chimiquement pur (les rouges neutres de certaines firmes sont absolument inutilisables) et dans la préparation du milieu, deux temps sont particulièrement délicats, la cuisson de la viande qui doit être très peu poussée, et l'alcalinité qui doit rester presque à la limite, très voisine de la neutralité.

Résultats obtenus

Nous avons examiné par la méthode du rouge neutre une trentaine de laits crus ou pasteurisés afin de pouvoir établir une technique permettant à l'avenir d'effectuer la numération, ou tout au moins de se rendre compte du degré de pollution du lait examiné.

Préalablement aux recherches bactériologiques nous nous sommes assurés des qualités des laits examinés pour savoir d'abord s'ils étaient crus ou pas-

teurisés, et aussi pour connaître leur degré de conservation.

Nous avons utilisé pour reconnaître la pasteurisation, la réaction de Dupouy au gaïacol, que l'on réalise aisément de la façon suivante :

A 5 cc. de lait, on ajoute 5 cc. d'une solution de gaïacol à 1 % et 2 gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. Si le lait est cru, une belle coloration saumon apparaît qui est due à l'oxydation du gaïacol sous l'influence de la peroxydase du lait. Si le lait a subi la pasteurisation, aucune coloration saumon n'apparaît. Notre recherche de la pasteurisation est cependant en défaut dans le cas où le lait aurait été pasteurisé par la méthode américaine connue sous le nom de pasteurisation basse. Dans ce cas — fort peu fréquent du reste dans nos régions — le lait pasteurisé donne la coloration saumon comme le lait cru.

La recherche de l'état de conservation du lait a été réalisée simplement par la prise de l'acidité par la méthode Dornic. Il est utile de rappeler que le lait frais, au sortir du pis de la vache, présente une acidité de 15° Dornic. Sous l'influence de ferments acidifiants qui transforment le lactose en acide lactique, l'acidité du lait se développe et lorsqu'elle atteint 25° Dornic le lait coagule à l'ébullition, ce que les ménagères traduisent en disant qu'il est tourné.

On comprend aisément que suivant le degré d'acidité du lait, sa teneur en microbes est éminemment variable et c'est un fait dont nous devons nous inspirer lorsque nous serons amenés à préconiser une technique de numération.

Voici résumée la série de nos expériences :

Lait N° 1

Lait cru. Acidité 19° Dornic.

Ce lait a été ensemencé dans le bouillon au rouge neutre préparé avec la solution à 5 % de rouge neutre. Il n'a pas été dilué. Les quantités suivantes ont été utilisées :

1 ^{er} tube	1 cc.	Réaction	+
2 ^e tube	0 cc. 75	—	+
3 ^e tube	0 cc. 50	—	+
4 ^e tube	0 cc. 25	—	+

Manifestement nos prises d'essai sont trop riches en microbes.

Pour la commodité du raisonnement, et bien que ce soit là une inexactitude, nous admettons que le virage est dû au seul colibacille. Nous admettons d'autre part qu'il suffit d'un seul individu bacillaire pour provoquer ledit virage et nous pouvons alors affirmer que notre lait contient plus de :

1.000

———— = 4.000 colibacilles par litre.

0,25

Avec le même lait nous avons ensemencé les mêmes quantités dans un bouillon préparé avec les mêmes doses d'une solution de rouge neutre à 10 %. Les résultats ont été les mêmes, c'est-à-dire :

1 cc.	Réaction	+
0 cc. 75	—	+
0 cc. 50	—	+
0 cc. 25	—	+

La réaction ne semble donc pas être fonction très étroite de la concentration du rouge neutre dans le bouillon. C'est pourquoi nous adoptons, dans la suite, le bouillon classique avec la solution au rouge neutre à 5 %.

Lait N° 2

Lait cru. Acidité 25° Dornic.

Ce lait a été dilué au 1/20, c'est-à-dire 1 cc. de lait pour 19 cc. d'eau stérilisée.

Les résultats de l'ensemencement ont été les suivants :

Avec 10 cc. de dilution, virage et réaction	+
5 cc.	— — +
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +

Notre dilution est donc encore insuffisante, mais nous pouvons affirmer que le lait examiné renferme plus de 20.000 colibacilles par litres, puisque 1 cc. de dilution au 1/20 donne encore une réaction +.

Lait N° 3

Laits pasteurisé. Acidité 17° Dornic.

Ce lait a été dilué au 1/50, soit 1 cc. de lait pour 49 cc. d'eau stérilisée.

Deux séries d'essais ont été effectuées avec la dilution :

1 ^{re} série : 10 cc. de dilution, virage	+
5 cc.	— — +
2 cc.	— — +
1 cc.	— virage douteux

2° série :	5 cc. de dilution,	virage	+
	2 cc. 1/2	—	—
	1 cc.	—	—
	1/2 cc.	—	—

Ces deux séries donnent des résultats à peu près superposables et nous permettent de conclure que le lait renferme moins de 50.000 colibacilles par litre, mais plus de 25.000.

Lait N° 4

Lait cru. Acidité 22° Dornic. Dilué au 1/50.

Résultat de deux séries d'ensemencement :

1 ^{re} série :	5 cc. de dilution,	réaction	+
	2 cc. 1/2	—	—
	1 cc.	—	—
	1/2 cc.	—	—
2° série :	2 cc. 1/2 de dilution,	réaction	+
	1 cc. 1/4	—	—
	1/2 cc.	—	—
	1/4 cc.	—	—

Ces résultats sont encore comparables et nous pouvons affirmer que le lait renferme au moins 200.000 colibacilles par litre.

Lait N° 5

Lait pasteurisé. Acidité 17° Dornic. Dilué au 1/50.

Résultat de l'ensemencement :

	5 cc. de dilution,	réaction	+
	2 cc. 1/2	—	douteuse
	1 cc.	—	—
	1/2 cc.	—	—

Le lait examiné renferme environ 20.000 colibacilles par litre.

Lait N° 6

Lait cru. Acidité 18° Dornic.

On pratique un premier essai avec une dilution au 1/50 :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	douteuse

Le même lait est dilué au 1/100 et le nouvel essai donne :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	douteuse
1/2 cc.	—	—

Les deux essais sont encore comparables, ce qui justifie en quelque sorte la méthode et nous pouvons affirmer que le lait contient environ 100.000 colibacilles au litre.

Lait N° 7

Lait cru. Acidité 21° Dornic.

Première dilution à 1/200 donne les résultats suivants :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	douteuse

Deuxième dilution à 1/400 donne les résultats suivants :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	+
1 cc.	—	douteuse
1/2 cc.	—	—

Les résultats sont encore comparables et permettent d'attribuer une teneur en colibacilles approximative de 400.000 par litre de lait.

Lait N° 8

Lait pasteurisé. Acidité 19° Dornic. Dilué au 1/50.

Résultat de l'ensemencement :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	+
1 cc.	—	+
1/2 cc.	—	douteuse
1/4 cc.	—	négative

Nous attribuons à ce lait une teneur approximative de 100.000 colibacilles par litre.

Lait N° 9

Lait cru. Acidité 20° Dornic. Dilué au 1/1000.

Résultat de l'ensemencement :

5 cc. de dilution,	réaction	—
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	—
1/4 cc.	—	—

Ce lait renferme donc moins de 200.000 colibacilles par litre. En réalité nous verrons que l'isolement ne nous a pas permis de mettre en évidence de bacilles.

Lait N° 10

Lait pasteurisé. Acidité 19° Dornic. Dilué au 1/50.

Résultat de l'ensemencement :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — —
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Ce lait contient donc une proportion de colibacilles comprise entre 20 et 50.000 par litre.

Lait N° 11

Lait cru. Acidité 19° Dornic.

Première dilution au 1/100 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — +
1/4 cc.	— — +

Deuxième dilution au 1/500 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — douteuse
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Les résultats fournis par la première série nous indiquent que le lait renferme plus de 400.000 colibacilles par litre. Ceux de la deuxième série nous montrent qu'en effet la teneur approximative est de 500.000.

Lait N° 12

Lait cru. Acidité 18° Dornic.

Première dilution au 1/100 :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	—
1/4 cc.	—	—
		douteuse

Deuxième dilution au 1/500 :

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	—
1/4 cc.	—	—
		douteuse

Une petite différence existe dans les deux résultats :
avec la première dilution nous concluerions à 400.000,
avec la deuxième dilution à 500.000 colibacilles par
litre.

Lait N° 13

Lait cru. Acidité 20° Dornic. Dilué au 1/750.

5 cc. de dilution,	réaction	+
2 cc. 1/2	—	—
1 cc.	—	—
1/2 cc.	—	—
1/4 cc.	—	—
		douteuse

Le lait contient donc au moins 750.000 colibacilles
par litre.

Lait N° 14

Lait cru. Acidité 29° Dornic. Dilué au 1/1000.

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Le lait contient donc au moins 1 million de colibacilles par litre.

Lait N° 15

Lait cru. Acidité 20° Dornic. Dilué au 1/750.

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Le lait examiné renferme donc au moins 750.000 colibacilles par litre.

Lait N° 16

Lait cru. Acidité 18° Dornic. Dilué au 1/750.

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — douteuse
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Le lait examiné renferme au plus 750.000 colibacilles par litre.

Lait N° 17

Lait pasteurisé. Acidité 17° Dornic. Dilué au 1/50 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — douteuse
1 cc.	— — —
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —

Le lait examiné renferme au plus 20.000 colibacilles par litre.

Lait N° 18

Lait cru. Acidité 20° Dornic. Dilué au 1/750 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — +
1/4 cc.	— — douteuse

Le lait examiné renferme au plus 3 millions de colibacilles par litre.

Lait N° 19

Lait cru. Acidité 19°5. Dilué au 1/750 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — douteuse
1/4 cc.	— — —

Le lait examiné renferme au plus 1.500.000 colibacilles par litre.

Lait N° 20

Lait cru. Acidité 41° Dornic. Dilué au 1/2000 :

10 cc. de dilution, réaction	+
5 cc. — —	+
2 cc. 1/2 — —	+
1 cc. — —	+
1/2 cc. — —	+
1/4 cc. — —	—

Le lait examiné qui est en état d'altération avancée renferme au moins 4 millions de colibacilles par litre.

Lait N° 21

Lait cru. Acidité 20° Dornic. Dilué au 1/1000 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2 — —	+
1 cc. — —	+
1/2 cc. — —	+
1/4 cc. — —	douteuse

Le lait examinée renferme au plus 4 millions de colibacilles par litre.

Lait N° 22

Lait cru. Acidité 19° Dornic. Dilué au 1/1000 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2 — —	+
1 cc. — —	+
1/2 cc. — —	+
1/4 cc. — —	—

Le lait examiné renferme au moins 2 millions de colibacilles par litre.

Lait N° 23

Lait cru. Acidité 19° Dornic. Dilué au 1/1000 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — +
1/4 cc.	— — +

Le lait examiné renferme donc plus de 4 millions de colibacilles par litre.

Lait N° 24

Lait cru. Acidité 30° Dornic. Dilué au 1/1500 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — douteuse
1/2 cc.	— — —
1/4 cc.	— — —
1/5 cc.	— — —

Le lait examiné renferme donc au plus 1 million 500 mille colibacilles par litre.

Lait N° 25

Lait cru. Acidité 27° Dornic. Dilué au 1/1500 :

5 cc. de dilution, réaction	+
2 cc. 1/2	— — +
1 cc.	— — +
1/2 cc.	— — douteuse
1/4 cc.	— — —
1/5 cc.	— — —

Le lait examiné renferme donc au plus 3 millions de colibacilles par litre.

Interprétation des résultats

Nous arrêtons là la liste des laits qui ont été examinés par la méthode au rouge neutre bien qu'une quinzaine d'autres échantillons aient été en plus prospectés. Mais comme d'une part ils n'apportaient rien de plus à l'appui de notre thèse, comme d'autre part nous n'avons effectué d'isolement ultérieurs que sur les 25 échantillons dont nous avons rapporté la réaction, il nous a paru plus sûr de tenir compte dans ce travail uniquement de ceux-là.

A l'examen des réactions obtenues quelques réflexions s'imposent tout d'abord: la quantité de microbes actifs sur le rouge neutre est extrêmement variable suivant les laits examinés et d'une façon générale elle est beaucoup plus grande dans les laits crus que dans les laits pasteurisés, ce qui n'a évidemment rien qui puisse nous surprendre.

De plus, on ne peut établir de relations, particulièrement étroites, entre l'acidité d'un lait et sa teneur en microbes actifs sur le rouge neutre.

Enfin, dans la traduction de nos résultats expérimentaux, nous avons donné des chiffres, ces chiffres,

il faut bien l'avouer, ne présentent pas la précision de données mathématiques ou physico-chimiques, mais si nous avons essayé d'exprimer nos résultats par des chiffres, c'est dans le but unique de permettre une comparaison plus facile. A ce point de vue seulement ils présentent une valeur et on peut les comparer, en ce qui concerne leur relativité, à ceux qui sont obtenus par les différentes méthodes de numération microbienne utilisées pour le lait.

Il doit également être entendu que si pour la commodité de l'expression des résultats, nous avons parlé seulement de colibacilles, d'autres microbes — également actifs sur le rouge neutre et dont la signification dans les eaux comme dans le lait est la même que celle du colibacille ont pu également intervenir dans nos recherches. De cela, nous avons dit et nous répétons que nous n'avons cure. Qu'avons-nous en effet recherché dans nos expériences? L'établissement d'une méthode de contrôle suffisamment précise et rapide qui nous permette d'évaluer le degré de pollution d'un lait de marché, et surtout de pollution par les matières excrémentielles. Il nous semble que, comme pour les eaux, la méthode au rouge neutre est susceptible de rendre des services et que nous sommes arrivés au résultat cherché à condition de préconiser dès maintenant et à la lumière de nos expériences une technique d'application.

Technique proposée. — Nous ne reviendrons pas sur la préparation du milieu de culture. La question a déjà été traitée et nous nous bornerons à indiquer les précautions à prendre pour l'ensemencement.

Il est indiqué de rechercher, d'abord, comme nous l'avons fait, si le lait à examiner est cru ou pasteurisé. par la méthode de la peroxydase, déjà décrite. Puis il faut déterminer l'acidité du lait. nous renvoyons, pour cette détermination, aux traités spéciaux de chimie appliquée au lait.

Enfin, le lait doit être dilué assez fortement, car contrairement à l'eau il est en général — et nos expériences le montrent — très riche en microbes. De plus, si on ensemencerait dans le bouillon du lait en nature, on introduirait d'assez grosses quantités de substances nouvelles — et notamment du lactose et de la caséine qui pourraient tout au moins modifier dans une certaine mesure les résultats.

Les règles générales de dilution qui résultent de nos expériences sont les suivantes:

1° *Pour le lait pasteurisé :*

a) Si l'acidité est comprise entre 17° et 19° la dilution au 1/50 nous paraît suffisante.

b) Si l'acidité est comprise entre 19° et 25°, diluer à 1/100.

2° *Pour le lait cru :*

a) Si l'acidité est comprise entre 17° et 19°, une dilution à 1/500 sera suffisante.

b) Entre 19° et 25°, diluer à 1/1000.

c) Entre 25° et 30°, diluer à 1/1500.

d) Entre 30° et 40°, diluer à 1/2000.

L'ensemencement aura lieu avec les quantités de dilution que nous avons utilisées, soit respectivement 5 cc., 2 cc. 1/2, 1 cc., 1/2 cc. et 1/4 cc. On pourra même resserrer les intervalles ou préparer plusieurs

séries, ce qui a l'avantage de permettre un contrôle.

L'examen des résultats de la réaction pourra avoir lieu au bout de 24 heures d'étuve à la température de 41°5. Nous conseillons de faire la lecture des résultats au bout de ce temps qui suffit bien dans tous les cas. La planche colorée que nous avons annexée à notre thèse et qui est due à M. Colonna, Secrétaire de la direction de l'Ecole Vétérinaire, a été réalisée d'après les exemples de réaction que nous lui avons soumis. On peut se rendre compte des différences très nettes que présentent le milieu de culture nonensemencé (tube N° 1), les réactions plus ou moins douteuses (tubes N° 2 et N° 3) et enfin les réactions positives (tube N° 4) et fortement positives (tube N° 5).

Nous insistons encore sur le fait que doivent seules être comptées comme réactions positives celles qui s'accompagnent à la fois du virage au jaune canari et de la fluorescence.

En résumé, si l'on tient compte des précautions que nous venons de signaler et si on applique scrupuleusement la technique indiquée, on doit obtenir des résultats qui concordent avec ceux que nous avons nous-même signalés.

Bouillon
non ensemené

2
Réaction douteuse
premier stade

3
Réaction douteuse
deuxième stade

4
Réaction positive
faible fluorescence

5
Réaction positive
forte fluorescence

N.	Gram.		Eau peptonnée lactosée tournesolée		Eau peptonnée glycosée tournesolée		Bouillon rouge neutre		Bouillon gélosée glycosée au rouge neutre		Lait Coagulation		Gélose a l'esculine		Indol
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h.	48 h.	24 k	48 h.	24 h.	48 h.	
1	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
2	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
3	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
4	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
5	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
6	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
7	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
8	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
9	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
10	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
11	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
12	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
13	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
14	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
15	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
16	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
17	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
18	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
19	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
20	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
21	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
22	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
23	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
24	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+
25	1	1	+	+	+	+	+	+							+
		2	+	+	+	+	+	+							+
		3	+	+	+	+	+	+							+

F = Fluorescence.

G = gaz

Isolement et propriétés biologiques des microbes rencontrés

Afin de nous rendre compte des propriétés bio-chimiques des microbes qui ont cultivé dans le bouillon au rouge neutre, nous avons cherché à les isoler et à les faire réagir sur quelques milieux particulièrement utilisés pour juger de leur activité biochimique.

L'isolement a été réalisé en diluant à deux reprises le bouillon au rouge neutre dans lequel avaient poussé les microbes et en ensemençant avec la deuxième dilution de la gélose lactosée tournesolée en boîtes de Pétri.

On a ainsi obtenu pour chaque échantillon de lait examiné plusieurs colonies que nous avons numéroté 1, 2, 3, etc...

Chacune des colonies a été examinée au microscope après coloration par la méthode de Gram, puis ensemencée sur gélose.

Enfin, nous avons fait réagir chacun des microbes isolés sur les milieux de culture suivants:

Eau peptonée lactosée tournesolée.

Eau peptonée glucosée tournesolée.

Bouillon au rouge neutre.

Bouillon gélosé glucosé au rouge neutre.

Lait.

Gélose à l'esculine.

Enfin, nous avons ensemencé chaque colonie en eau peptonée pour la recherche de l'Indol.

Les résultats obtenus au bout de 24 et de 48 heures

ont été consignés dans un tableau annexé à notre travail. Nous avons pratiqué l'examen de 56 colonies ainsi isolées, dont 45 étaient formées par des bacilles et 11 par des cocci, les uns de nature streptococcique et en chaînette ou en diplocoques, et une fois seulement groupés en staphylocoques. Sur les 45 souches bacillaires, 8 seulement se sont montrées gram positives, 37 sont, au contraire, gram négatives. Les cocci prennent ou ne prennent pas le gram.

L'eau peptonée lactosée tournesolée a viré au rouge, sauf pour les colonies (1):

1 - 2
4 - 2
10 - 2
18 - 1
20 - 1
21 - 2
21 - 3
23 - 2
24 - 2

L'eau peptonée glycosée tournesolée n'a pas viré à peu près pour les mêmes colonies que celles précédemment indiquées.

Le bouillon au rouge neutre a viré pour toutes les colonies, sauf les suivantes:

9 - 1 (diplocoques - chaînettes gram +)
10 - 2 (diplocoques gram +)
13 - 2 (petit bacille gram —)
16 - 2 (petit bacille gram —)

(1) Le premier chiffre est le numéro de l'échantillon de lait, le deuxième le numéro de la colonie isolée de cet échantillon.

Pour le bouillon glucosé gélosé tournesolé nous notons des virages irréguliers, parfois disparaissant entre la 24° et la 48° heure, faits sur lesquels nous nous sommes déjà expliqués.

Le lait n'a pas été coagulé par les souches:

1 - 1	10 - 2	20 - 3	23 - 2
1 - 2	13 - 1	21 - 1	24 - 2
2 - 1	16 - 2	21 - 2	25 - 1
4 - 2	20 - 1	21 - 3	

Toutes les autres l'ont coagulé soit en 24 heures, soit en 48 heures.

La gélose à l'esculine a viré dans tous les cas, sauf pour les souches suivantes, soit au bout de 24 heures, soit au bout de 48 heures:

1 - 2	4 - 2	7 - 4	11 - 2	17 - 1	21 - 2	23 - 2
1 - 4	5 - 1	7 - 5	12 - 1	18 - 1	21 - 3	24 - 2
2 - 1	7 - 1	10 - 1	13 - 1	20 - 1	22 - 1	
3 - 1	7 - 2	10 - 3	16 - 2	21 - 1	23 - 1	

La réaction de l'Indol a été positive ou faiblement positive sur 35 souches.

Conclusions

I. — La méthode au rouge neutre a pris rang, depuis une vingtaine d'années, parmi les moyens de recherches rapides du colibacille dans l'eau de boisson.

II. — La méthode n'a jamais été tentée avec succès dans les recherches du colibacille dans le lait.

III. — D'après les expériences qui précèdent, nous croyons être en droit d'affirmer que :

1° Du lait contenant des colibacilles ensemencés en bouillon au rouge neutre, mis à l'étuve à 41°5, donne, dans les 24 heures, un virage au jaune canari avec fluorescence verte.

2° La réaction au jaune canari avec fluorescence verte est constante, rapide, présente réellement peu de causes d'erreur.

3° Cette réaction est très sensible.

IV. — La réaction est due à la réduction du rouge neutre en milieu alcalin (ammoniaque).

V. — Les sucres gênent la réaction. Il est indispensable de les supprimer dans la composition du milieu (Rochaix).

VI. — Il en est de même de la présence de l'oxygène de l'air. Aussi est-il préférable de faire les cultures en anérobiose comme l'ont proposé Fabre-Domergue et Legendre.

VII. — En se plaçant dans toutes les conditions énumérées, on réduira au minimum le nombre des erreurs.

Malgré tout, on ne devra jamais affirmer la présence du colibacille dans le lait sans l'avoir isolé et en avoir établi les caractères cultureux, biochimiques et les caractères de coloration.

VIII. — La teneur du lait pasteurisé en colibacilles est considérablement moindre que celle du lait cru.

IX. — Pour les raisons que nous avons indiquées, la recherche des caractères différenciant les colibacilles d'origine fécale récente des autres, ne présente pas de véritable intérêt pour le lait.

Vu : Le Directeur
par intérim,
de l'Ecole Vétérinaire de Lyon,
V. BALL.

Le Professeur
de l'Ecole Vétérinaire,
A. TAPERNOUX.

Vu : Le Doyen,
JEAN LÉPINE.

Le Président de la Thèse,
ROCHAIX.

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 7 Décembre 1931.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE

Bibliographie

- AYERS (S. Henry) et JOHNSON (Ir. W. T.). — La résistance du colibacille à la pasteurisation. (*Journal of Agriculture Al Research*, Département of Agriculture, vol. III, N° 5, pp. 401-410. 15 février 1915.) — *Le Lait*, 1926, p. 367.
- ASCOLI. — B. C. C. e lo sua Termogenesi Stomaco. (Napoli, VII, 25, 1901).
- ALBA. — Über ein verfahren den B. C. C. schnell und sicher aus dem Wasser zu isolieren. (Cf. *Baekt* XIX, p. 13, 1896.)
- Sulla presenza del B. coli nelle acque potabili e sopra un methodo per metterlo in evidenze. (*Rif. med.* XI, 302, 1895.)
- BABÈS et FEODORASCO. — Sur deux microbes intermédiaires entre le paratyphique B. et le bacille typhique. (C. R. Soc. de Biol., 1909, p. 787.)
- BRAUN. — Le rouge neutre et le diagnostic de la souillure des eaux de boisson par le colibacille. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. IV, N° 13, 15 juillet 1906.
- BUCHHOLZ. — Zur Kulturellen unterscheidung der Typhus Paratyphus. Colibactérien untereinander. (*Zeitschrift für Hyg.* Bd., LVI, 1907, p. 220.)
- BULIR. — Bedeutung und Nachweis de bacterium Coli in Wasser und eine nem modifikation de Tijkmaunschen methode. *Archiv. für Hyg.* LXII, 1, 14, 1907.
- CHANTEMESSE et WIDAL. — Differenciation du B. typhique et du Coli Communis. (C. R. de l'Acad. des Sciences, 9 novembre 1889.)

- CAMUS (L.). — Des « tests » microbiologiques de contamination dans le contrôle du lait. (*Thèse de Lyon*, 1921.)
- COURMONT. — *Précis de Bactériologie*, 5^e édition, p. 434.
- COURMONT et ROCHAIX. — *Précis d'Hygiène*, Masson, 1921.
- CHICK. — The distribution of B. C. C. Thompson Jates. (*Labor. rep.* vol. I, 1900.)
- DEN DOOREN DE JONG. — La détermination de la présence du « B. Coli » dans le lait pasteurisé.
- Het Algemeen Zuivel en Melkhygienisch weekblade. 21^e année, N° 6, février 1925, p. 101-102.
- *Le Lait*, 1926, p. 366.
- EIJKMANN. — *Central für Bakter orig.* Bd. XXXVI, pp. 742-752, 1904.
- ELSNER. — Untersuchungen uber electives Wachstum des B. Coli und des B. typhique, und dessen diagnostische verwertbarkeit. (*Zeit. f. Hyg.*, XXI, 1895.)
- ETIENNE. — Note sur une modification de la coagulation du lait par le B. coli communis. (C. R. Soc. de Biol., 20 jan. 1894.)
- FREGONNEAU. — Ueber die Wirkung von B3kterien auf Azo-farbstoffe. (*Central für Bakt. Orig.* Bd. XLIX, 1909, p. 276.)
- FREUNDENREICH. — De la recherche du B. C. C. dans l'eau. (*Ann. de Microg.*, VIII, p. 414, 1896.)
- FERRERA, HORTA et PAREDES. — *Arch. de l'Inst. royal de Bact. de Comera pestana*, II, 1908, p. 153.
- GÈZES. — De la recherche du bacille d'Eberth dans les eaux de boisson. (*Thèse de Lyon*, 1902.)
- GELESKOFF. — Contribution expérimentale à la connaissance des méthodes propres à déceler dans l'eau le B. T. et les variétés de B. C. (*Thèse de Montpellier*, 1901.)
- GRIMBERT. — Action du B. C. C. et du B. T. sur les nitrates. (C. R. Soc. Biol., 10 décembre 1898.)
- GORINI (C.). — Sul comportamento del Bacterium coli nell latte. (Rendiconti d. R. Acad. dei Lincei, t. XXIX, ser. 5 a., 1920.)

- GUERBET. — Etude de la réaction du rouge neutre au point de vue chimique. (C. R. Soc. de Biol., 1911, p. 514.)
- Nouvelle méthode de dosage des sels ferriques en présence des sels ferreux et de matières organiques. C. R. Soc. de Biol., 1911, p. 848.)
- HARRISSON et VAN DER LECK. — Aesculinbile salt media for water analysis. *Centrblatt für Bacteriologie*, II, p. XXII, 1909, pp. 547-551.
- HALLÉ et DISSARD. — Note sur la culture du B. Coli communis dans l'urine. (C. R. Soc. Biol., p. 320, 1893.)
- HUNTER. — *British. Med. Jour*, N° 2125, pp. 591, 1901.
- KIESSLING. — Das B. Coli communis. (Hygienische Rundschau, 15 août 1893.)
- KOHLER et SCHEFFLER. — *Munch Med. W.* 29 mai, 1900.
- KUFFERATH (H.). — Contrôle bactériologique et hygiénique des laits. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1919, p. 462.)
- LACOMME. — La recherche rapide du coli-bacille dans les eaux de boisson par la méthode du Neutrol-roth. *Journal de Physio. et Patho-Géné*, 1910, p. 90.
- LAPIERRE. — Le B. C. C. et ses variétés. (C. R. Soc. Biol., 779, 1901.)
- LEMBKE. — Bacterium Coli anindolicum und B. Coli anaerogenes. (*Arch. f. Hyg.*, XXVII, p. 384, 1896.)
- LESAGE. — Contribution à l'étude du B. Coli communis. (*Sem. Méd.*, N° 6, 1892.)
- LOHNIS. — *Précis de Bactériologie agricole et de technique expérimentale*, traduction française par Kufferath. (Lamertin, éd., Bruxelles, 1921.)
- MAKGILL. — The neutral-red reaction as a means detecting B.C. in water supplies. (*Jour. of Hyg.*, 1901, p. 430.)
- MANDOUL et GRUAT. — Contribution à l'étude bactériologique des eaux. Les bacilles coliformes. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIX, 1915, p. 459.
- MACÉ. — *Traité de Bactériologie*, 1913, t. II, p. 810.

- MÉRIEUX et CARRÉ. — Contribution à la recherche du B. C. C. et du B. T. dans les eaux potables. (*Lyon Méd.*, 13 nov. 1898, p. 335.)
- OLDEKOP. — *Centr. für Bakter. orig.* Bd. XXXV, p. 120.
- PORCHER (Ch.). — L'Hygiène du lait, Reims, 1912.
- POUJOL. — Sur la fréquence du B. C. C. dans les eaux potables. (C. R. de Soc. de Biologie, 20 nov. 1897.)
- RACE (J.). — The Examination of milk for public health purposes, 1918.
- REFIEK. — Sur les divers types de colibacilles des eaux. (*Ann. Inst. Pasteur*, LX, 1896, p. 292.)
- ROTHBERGER. — *Differenzialdiagnostische Untersuchungen mit Gefärbten Nährböden.* C. f. B. t. XXIV, 1898, p. 513 et t. XXV, 1898, pp. 15 et 69.
- ROUX. — Sur une oxydase (culture sur artichaut) productrice du pigment sécrété par le B. C. C. (C. R. Acad. des Sc., 1899, p. 693.)
- ROUSSEL. — C. R. Soc. de Biol., 2 mai 1914.
- ROCHAIX. — Une nouvelle cause d'erreur dans la recherche du colibacille en milieu au neutral-roth. Soc. Méd. des Hôpitaux de Lyon, 2 fév. *Lyon Médical*, 21 février 1909.
- Présence des sucres (lactose, glycose) dans les bouillons du rouge neutre, destiné à la recherche rapide du colibacille dans les eaux de boisson. *Revue d'Hygiène et de police sanitaire*, t. XXXVI, N° 2, 20 février 1914, p. 143.
- Recherche rapide de la contamination des eaux de boisson. *Revue d'Hyg. et de Police sanit.*, juillet-août 1917, p. 472.
- Milieux à l'esculine et colibacilles. (C. R. Soc. de Biol., t. LXXXIX, p. 1042, 19 novembre 1923.)
- La recherche du colibacille dans l'eau et dans le lait du moyen milieu à l'esculine. *Le Lait*, 1924, p. 541.
- ROCHAIX (A.). — Standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux. *Rev. d'Hygiène*, t. XLVII, 1925, p. 1148.

- ROCHAIX et A. DUFOUT. — Contribution à l'étude des urobac-
téries. (C. R. de la Soc. de Biologie, 29 octobre 1910.)
- Signification de la réaction du neutral-roth. (C. R.
Soc. de Biol., 1910, p. 326.)
- Remarques sur la réaction du neutral-roth. (C. R. de
la Soc. de Biologie, 29 octobre 1910.)
- RODET. — De l'importance de la température dans la détermi-
nation des espèces microbiennes en général et spéciale-
ment du B. typhique. (C. R. Soc. de Biol., 29 juin
1889.)
- SAVAGE (W.-G.). — The significance of B. C., in drinking
water. (*Journ. of Hyg.*, vol. II, N° 3, 1902, p. 320.)
- Neutral-led in the routine basteriologique examina-
tion of water. (*Brit. med. journ.*, 400, 1901.)
- SILVESTRI. — Sopra alcuni carattere de differenziano netta-
mente il B. typhosus del B. Coli communis. (*Riv. gen.
ital. di Clinica med.*, 1892.)
- SICRE. — Au sujet du rouge neutre comme indice du coliba-
cille. (C. R. Soc. de Biol., 1909, t. LXVI, p. 152.)
- TANNER (W.) et DUBOIS-GRANVILLE (C.). — Quelques notes sur
l'influence de la chaleur sur les organismes du groupe
coli-typhique dans le lait. *Le Lait*, 1927, p. 287.
- TAPERNOUX. — Industrie et contrôle des produits d'origine
animale. (Cours de 1930-31.)
- VALLET. — Le B. C. dans ses rapports avec le B. typhique.
(*Thèse Lyon*, 1892.)
- VERGE et THIEULIN. — Pour la culture des staphylocoques.
(C. R. Soc. de Biol., 1930, p. 850.)
- VINCENT. — La recherche du B. typhique et du B. coli dans les
eaux de boisson. (Intern. Cong. Hyg. a Dem., 1891, II,
278, London.)
- La détermination bactériologique et le dosage du
Bacillus Coli dans l'eau de boisson. *L'Hygiène Générale
et Appliquée*, t. IV, fév. 1909, p. 78.
- Sur un nouveau procédé d'isolement du bacille ty-
phique dans l'eau. (C. R. Soc. de Biol., 1890, p. 62.)

- Sur la signification du Bacille Coli dans les eaux potables. *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, p. 233.
- VOLF. — Zur Reduktionsfähigkeit der Bakterien. *Central für Bakt.* Bd. XXVII, 1900, p. 899.
- WURST. — Note sur deux caractères différentiels entre le bacille d'Eberth et le bacterium coli Commun. (C. R. Soc. de Biol., 1891, p. 828.)
- ZAYKOWSIKI (F.) et STAFFE (E.). — Dégradation des protéines du lait par les bactéries du groupe coli-typhique (salmonellose). *Milchwirtschaftliche Forschungen*. T. 5, N° 3-4, pp. 361-373, janvier 1928. *Le Lait*, 1930, p. 186.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION. — Les sources de contamination du lait..	9
CHAPITRE PREMIER. — Le Colibacille	11
CHAPITRE II. — Revue générale des principaux procédés	23
CHAPITRE III. — Le Bacterium Coli dans le lait.....	53
Application de la Méthode du rouge neutre à la re- cherche du Colibacille dans le lait.....	60
Interprétation des résultats	75
Isolement et propriétés biologiques des microbes rencontrés	80
CONCLUSIONS	83
BIBLIOGRAPHIE	85



BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU

00 00 IMPRIMEURS-ÉDITEURS 00 00

00 42, QUAI GAILLETON, 42 00

00 00 00 00 LYON 00 00 00 00



